ALEXANDRU GIOABĂ
ELENA POPA

BIOCHIMIE STRUCTURALĂ

PARTEA I

Editura Universităţii din Bucureşti

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Prof. dr.
ALEXANDRU GIOABĂ

Conf. dr.
ELENA POPA

BIOCHIMIE STRUCTURALĂ

Partea I

Editura Universităţii din Bucureşti
– 2001 –

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ
BUCUREȘTI
COTA IV 507071
911/01

Referenți științifici: **Prof. dr. ANCA NICOLAE**
Prof. dr. ADALGIZA CIOBANU

© Editura Universității din București
Șos. Panduri 90-92, București - 76235; Tel./Fax: 410.23.84
E-mail: editura@unibuc.ro
Internet: www.editura.unibuc.ro

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României
GIOABĂ, ALEXANDRU

Biochimie structurală / Alexandru Gioabă, Elena Popa - Bucureşti, Editura Universității din Bucureşti, 2001
p. ; cm.
Bibliogr.
ISBN 973-575-565-3

I. Popa, Elena

577.1

B.C.U. Bucuresti
C20017479

Culegere şi tehnoredactare computerizată: ***Daniela Veronica Ghica***

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

PREFAȚĂ

Biochimia studiază materia vie şi fenomenele ei specifice, din punct de vedere al constituției chimice, al organizării moleculare, al interacțiilor dintre biomoleculele componente, precum şi al căilor de transformare a acestora, în permanenta lor legătură cu mediul înconjurător.

Din punct de vedere al problematicii de studiu, biochimia cuprinde două părți principale: Biochimia structurală (descriptivă sau statică) şi Biochimia metabolismului (sau dinamică), strâns legate între ele.

Această lucrare "Biochimia structurală" îşi propune prezentarea sistematizată şi actualizată a aspectelor biochimiei descriptive.

Datorită diversității problemelor luate în studiu ca şi a varietății materialului bibliografic vast pe care se bazează, "Biochimia structurală" cu care autorii se prezintă în fața studenților şi tinerilor specialişti interesați în domeniu, va fi redactată şi publicată, la rându-i, în două părți: prima parte, incluzând capitolele de glucide, aminoacizi, peptide, proteine, enzime şi, a doua, care cuprinde lipidele, acizii nucleici (şi constituenții lor structurali), vitaminele şi hormonii. S-a avut şi se va avea în vedere pe tot cuprinsul materialului redactat, evidențierea relației strânse dintre structura chimică şi activitatea biologică a biomoleculelor luate în studiu.

Conținutul cărții, axat în principal pe cursul de Biochimie generală predat în cadrul Secției de Biochimie tehnologică de la Facultatea de Chimie din Universitatea Bucureşti, se adresează în egală măsură şi studenților care studiază această disciplină în cadrul altor institute de învățământ superior.

De asemenea, cartea este recomandată şi studenților de la secțiile de masterat de profil, ca şi tinerilor cercetători biochimişti.

Datorită vastității materialului consultat pentru redactarea lucrării, s-a optat pentru prezentarea unei bibliografii selective.

Autorii mulțumesc referenților, care, prin sugestiile făcute, au ajutat la elaborarea acestei lucrări, ca şi specialiştilor în domeniu, care ne pot comunica părerile şi eventualele observații, în scopul perfecționării prezentului material.

Autorii

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

CUPRINS

	Pag.
PREFAȚĂ	2
I. GLUCIDE	9
I.1. Monoglucide naturale şi derivați ai lor	10
I.1.1. Trioze	12
I.1.2. Tetroze	12
I.1.3. Pentoze	13
I.1.3.1. D-Riboza şi 2-deoxi-D-riboza	13
I.1.3.2. D-Ribuloza	13
I.1.3.3. L-Arabinoza	14
I.1.3.4. D-Xiloza	14
I.1.3.5. L-Xiluloza	15
I.1.4. Hexoze	15
I.1.4.1. D-Glucoza	15
I.1.4.2. Derivați ai glucozei	16
I.1.4.3. D-Galactoza	22
I.1.4.4. D-Manoza	23
I.1.4.5. D-Fructoza	24
I.1.4.6. Alți derivați ai monoglucidelor, de importanță biochimică	26
I.2. Oligoglucide	29
I.2.1. Diglucide	29
I.2.1.1. Maltoza	29
I.2.1.2. Celobioza	30
I.2.1.3. Lactoza	31
I.2.1.4. Zaharoza	32
I.2.1.5. Genţiobioza	34
I.2.2. Triglucide	34
1.2.2.1. Rafinoza	34
I.2.2.2. Genţianoza	35
I.2.2.3. Melicitoza	36
I.2.3. Tetraglucide	36
I.2.4. Hexaglucide	37
I.3. Poliglucide	38
I.3.1. Poliglucide de rezervă	39
I.3.1.1. Amidonul	39

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Pag.
I.3.1.2. Glicogenul 42
I.3.1.3. Inulina 43
I.3.2. Poliglucide structurale 44
I.3.2.1. Poliglucide structurale din regnul vegetal 44
1.3.2.2. Poliglucide structurale de origine animală 51
1.3.2.2.1.Mucopoliglucide acide 51
1.3.2.2.2.Mucopoliglucide neutre 56

II. AMINOACIZI 58
II.1. Stereochimie 58
II.2. Nomenclatură şi clasificare 59
II.2.1. Aminoacizi naturali "standard" 59
II.2.2. Aminoacizi "nestandardizaţi" (mai rar întâlniţi în proteine) 62
II.2.3. Aminoacizi naturali "nestandardizaţi" neconstituenţi ai proteinelor 64
II.3. Proprietăţile aminoacizilor prezenţi în proteine 66
II.3.1. Proprietăţile fizice ale aminoacizilor 67
II.3.1.1. Punct izoelectric 69
II.3.1.2. Titrarea soluţiilor apoase de aminoacizi 70
II.3.2. Proprietăţile chimice ale aminoacizilor 72
II.4. Transformările biochimice ale aminoacizilor 74
II.4.1. Dezaminarea oxidativă a aminoacizilor 75
II.4.2. Transaminarea aminoacizilor 76
II.4.3. Reacţii de decarboxilare a aminoacizilor 79
II.4.4. Dezaminare şi decarboxilare simultane 81
II.4.5. Reacţii de transamidinare 82
II.4.6. Reacţii de transmetilare 82
II.4.7. Alte transformări biochimice ale aminoacizilor 84
II.5. Rolul biologic al aminoacizilor 86

III. PEPTIDE 88
III.1. Clasificare 88
III.2. Nomenclatură 88
III.3. Structura peptidelor 90
III.3.1. Structura primară (structura covalentă) 92
III.3.1.1. Determinarea structurii primare 93
III.3.1.1.1. Identificarea şi dozarea aminoacizilor constituenţi 94
III.3.1.1.2. Determinarea aminoacidului N-terminal 94

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Pag.
III.3.1.1.3. Determinarea aminoacidului C-terminal 98
III.3.1.1.4. Metode enzimatice 99
III.4. Proprietăți generale 103
III.4.1. Activitatea optică 103
III.4.2. Proprietăți acido-bazice (electrochimice) 104
III.4.3. Proprietăți chimice 104
III.5. Metode de obținere a peptidelor 105
III.5.1. Extracția peptidelor din materiale biologice 105
III.5.2. Obținerea peptidelor prin hidroliza parțială a proteinelor 105
III.5.3. Metode generale de sinteză a peptidelor 106
III.5.3.1. Metode clasice de sinteză a peptidelor 107
III.5.3.2. Sinteza peptidelor pe suport solid (sinteza Merrifield) 110
III.6. Peptide naturale 114
III.6.1. Peptide neproteice 115
III.6.2. Peptide cu acțiune antibiotică sau toxică 120
III.6.2.1. Cicloserina (oxamicina sau seromicina) 120
III.6.2.2. Peniciline 121
III.6.2.3. Cefalosporine 123
III.6.2.4.Gramicidine 125
III.6.2.5.Tirocidine 127
III.6.2.6.Bacitracine 128
III.6.2.7.Depsipeptide 129
III.6.2.8.Actinomicine 129
III.6.2.9.Peptide toxice 131
III.6.2.10.Ionofori 132

IV. PROTEINE 135
IV.1. Generalități 135
IV.2. Structura proteinelor 135
IV.2.1. Structura primară 136
IV.2.2. Structura secundară 138
IV.2.2.1. Modelul α-helix 138
IV.2.2.2. Modelul în "planuri pliate" (foaie pliată sau conformația β) 142
IV.2.2.3. Modelul de tip colagen 145
IV.2.3. Structura terțiară 149
IV.2.4. Structura cuaternară 153
IV.3. Proprietăți generale 155

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Pag.
IV.3.1. Solubilitatea, precipitarea şi denaturarea proteinelor 155
IV.3.2. Caracterul coloidal al soluțiilor proteice 161
IV.3.3. Proprietățile acido-bazice ale proteinelor 162
IV.3.4. Proprietățile optice ale proteinelor 164
IV.3.5. Absorbții caracteristice în ultraviolet şi vizibil 165
IV.3.6. Proprietăți chimice 165
IV.3.6.1. Reacții comune 165
IV.3.6.2. Reacții de culoare 167
IV.3.7. Proprietățile biochimice ale proteinelor 169
IV.4. Clasificarea proteinelor 175
IV.5. Proteine simple (holoproteine) 175
IV.5.1. Proteine globulare 175
IV.5.2. Proteine fibrilare 179
IV.5.3. Holoproteine miofibrilare 185
IV.5.3.1. Proteine din filamentele groase 186
IV.5.3.2. Proteine din filamente subțiri 188
IV.6. Proteine conjugate (heteroproteine sau proteide) 190
IV.6.1. Fosfoproteine 190
IV.6.1.1. Fosfoproteine din lapte 190
IV.6.1.2. Fosfoproteine din ou 191
IV.6.2. Glicoproteine 191
IV.6.3. Lipoproteine 193
IV.6.4. Metaloproteine 196
IV.6.5. Cromoproteine 198
IV.6.5.1. Clasificarea cromoproteinelor 199
IV.6.5.1.1. Cromoproteine porfirinice cu funcție respiratorie 199
IV.6.5.1.2. Cromoproteine porfirinice fără funcție respiratorie 218
IV.6.5.1.3. Cromoproteine neporfirinice cu funcție respiratorie 222
IV.6.5.1.4. Cromoproteine neporfirinice fără funcție respiratorie 224
IV.6.5.1.4.1. Carotenoproteine 224

V. ENZIME 225
V.1. Nomenclatură 226
V.2. Structura enzimelor. Mecanismul reacțiilor enzimatice 227
V.2.1. Situsul 227
V.2.2. Stabilitatea complexului enzimă – substrat 228
V.2.3. Rolul apei în sistemele biologice 231

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Pag.
V.2.4. Coenzimele 232
V.2.5. Inhibitorii enzimatici 233
V.2.5.1. Inhibitorii competitivi 234
V.2.5.2. Inhibitorii necompetitivi 234
V.2.5.3. Inhibitorii alosterici 234
V.2.6. Factori care influențează cinetica reacțiilor enzimatice 235
V.2.6.1. Influența concentrației enzimei 235
V.2.6.2. Influența pH-ului 236
V.2.6.3. Influența temperaturii 237
V.2.6.4. Durata contactului dintre enzimă şi substrat 237
V.2.6.5. Influența substratului 238
V.2.6.6. Alți factori care pot influența activitatea unei enzime 240
V.2.7. Unități de activitate enzimatică 241
V.2.8. Izoenzime 241
V.2.9. Sisteme enzimatice multisecvențiale 243
V.2.9.1. Sisteme disociate 244
V.2.9.2. Sisteme asociate 244
V.2.10. Reglarea activității enzimatice 245
V.2.10.1. Efectori alosterici 245
V.2.10.2.Formarea de enzime active din precursori inactivi 246
V.2.11. Reglarea sintezei de enzime 248
V.2.11.1. Inducerea de enzime 248
V.2.11.2. Represia 248
V.2.11.3. Derepresia 248
V.3. Enzime cu specificitate de reacție 249
V.3.1. Oxidoreductaze (clasa E.C.1) 250
V.3.1.1. Oxidoreductaze NAD^+ dependente 250
V.3.1.2 Oxidoreductaze $NADP^+$ dependente 252
V.3.1.3. Enzime FAD-dependente 252
V.3.1.4. Oxidoreductaze de natură hemoproteică (hemoenzime) 253
V.3.1.5. Hidrogenaze 253
V.3.1.6. Oxigenaze 254
V.3.2. Transferazele (clasa E.C. 2) 255
V.3.2.1. Aciltransferaze 255
V.3.2.2. Aminotransferaze (transaminaze) – subgrupa 2.6.1 258
V.3.2.3. Metiltransferaze 259
V.3.2.4. Alte alchiltransferaze 260

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Pag.
V.3.2.5. Glicozil-transferaze 260
V.3.2.6. Fosfotransferazele 261
V.3.2.7. Transferaze ale grupelor cu sulf 262
V.3.3. Hidrolaze (clasa E.C.3) 262
V.3.3.1. Esteraze şi glicozidaze 262
V.3.4. Liaze (clasa E.C.4) 267
V.3.5. Izomeraze 268
V.3.6. Ligaze (sintetaze) 270
V.4. Specificitatea de substrat a enzimelor 271
V.4.1. Enzime cu specificitate absolută de substrat 272
V.4.2. Enzime cu specificitate largă de grup 272
V.4.3. Enzime cu specificitate restrânsă de grup 273
V.4.4. Enzime cu stereospecificitate de substrat 273
V.5. Importanţa determinărilor de enzime în diagnosticarea unor maladii 276

BIBLIOGRAFIE 279

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

I. GLUCIDE

Glucidele (hidraţii de carbon, zaharurile) sunt constituenţi majori ai tuturor organismelor vegetale şi animale. Dintre acestea, monoglucidele (monozaharidele) reprezintă unităţile constitutive ale unei clase importante de biomolecule (poliglucide), formate ca rezultat al evoluţiei, selecţiei şi diversificării organismelor.

Importanţa hidraţilor de carbon pentru fiinţele umane este deosebită. Practic, întreaga noastră viaţă se desfăşoară în interacţie cu aceşti compuşi, plecând de la alimente, textile, materiale lemnoase şi sfârşind cu hârtia fără de care n-ar putea fi concepute bancnotele, cecurile, cărţile, ziarele, actele, ambalajele, diplomele de studii etc.

În organismele vii, glucidele joacă rol structural sau energetic. Transformările lor metabolice conduc la derivaţi importanţi pentru biosinteza celorlalte biomolecule (proteine, acizi nucleici, lipide), ca şi a unor constituenţi de bază ai acestora (aminoacizi, nucleotide, acizi graşi etc.).

De asemenea, derivaţi ai glucidelor servesc ca intermediari în biosinteza vitaminelor, hormonilor, antibioticelor etc.

În natură, biosinteza glucidelor are loc în plantele verzi (prin fotosinteză) din dioxid de carbon şi apă:

$$6CO_2 + 6H_2O \underset{\text{-energie (metabolism animal)}}{\overset{h\nu/\text{clorofilă}}{\rightleftharpoons}} C_6(H_2O)_6 + 6O_2$$

Cum fotosinteza decurge cu consum înalt de energie, fiind defavorizată termodinamic, ea poate avea loc doar în prezenţa luminii solare (a radiaţiilor UV) şi a pigmenţilor din plantele verzi (clorofila verde sau albastră).

Procesul invers, de "ardere" a hidraţilor de carbon cu consum de oxigen, are loc în metabolismul animalelor care respiră, conducând la degajare de energie necesară întreţinerii vieţii acestora.

Organismele animale îşi procură glucidele necesare pe cale exogenă (hrănindu-se cu plante) sau endogenă (glucidele se formează în organism, din substanţe glucoformatoare). Astfel, dacă în plante glucidele au o pondere de 50-80% din materialul uscat, în regnul animal (cu excepţia unor nevertebrate) ele se găsesc în proporţie de 1-5%.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În capitolul de față, consacrat glucidelor, acestea vor fi tratate selectiv, în corelație cu rolul lor biochimic (structural şi metabolic), structura, stereochimia şi proprietățile lor chimice fiind însuşite anterior, prin studiul **Chimiei Organice**.

Glucidele sunt polihidroxialdehide sau polihidroxicetone şi unii derivați funcționali ai acestora. Importanța lor biochimică va fi discutată în corelație cu cele trei subclase de hidrați de carbon: mono-, oligo- şi poliglucide.

I.1. Monoglucide naturale şi derivați ai lor

În organismele vegetale şi animale, monoglucidele sunt prezente în stare liberă sau combinate cu alte substanțe; ele participă la o serie de transformări biochimice sau îndeplinesc anumite funcții biologice.

Unele monoglucide naturale se găsesc numai in stare legată, sub formă de combinații.

Reprezentarea formulelor structurale ale glucidelor

În ceea ce priveşte reprezentarea structurii ciclice a glucidelor (rezultată printr-o semiacetalizare intramoleculară), se utilizează în mod frecvent trei tipuri de formule:

-formulele de proiecție plană Fischer (fig.I.1a), cu care se operează adesea datorită simplității lor;

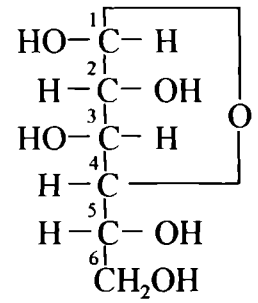
-formulele perspectivice (Haworth), în care ciclurile semiacetalice (furanozice sau piranozice) ale monoglucidelor sunt reprezentate (fig.I.1b) sub formă de poligoane regulate (de 5 şi 6 atomi);

-dacă pentru ciclurile furanozice (de 5 atomi) formula perspectivică simplificată se apropie mult de realitate (diferența dintre unghiurile din ciclul pentagonului regulat şi cele din atomul de carbonul tetraedric, cu hibridizare sp^3, fiind foarte mică), în cazul ciclurilor piranozice (de 6 atomi), hibridizarea sp^3 impune existența unor cicluri necoplanare, cu structură spațială stabilă de tip "scaun" (ca accea a ciclohexanului). În acest caz, cea mai corectă reprezentare este formula stereochimică conformațională (fig.I.1c).

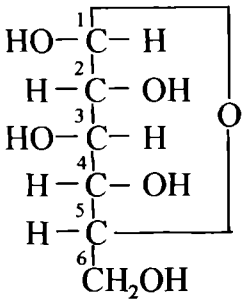
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

a) Formule de proiecție plană (Fischer)

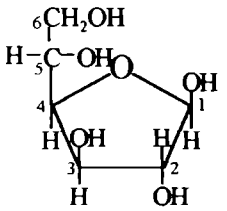
β-D-glucofuranoză

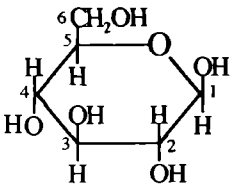


β-D-glucopiranoză



b) Formule perspectivice (Haworth)





c) Formula stereochimică conformațională pentru β-D-glucopiranoza

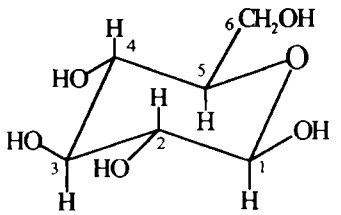


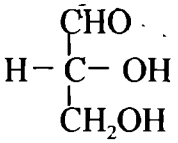
Fig.I.1 - Formule de reprezentare a structurilor ciclice ale β-D-glucozei

În stare liberă, hexozele şi majoritatea pentozelor au structură piranozică, mai săracă în energie şi deci mai stabilă decât structura furanozică. Aceasta din urmă este însă prezentă frecvent în oligo- şi poliglucide.

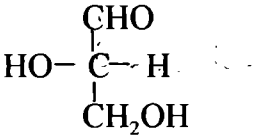
De asemenea, cele mai stabile forme naturale ale glucidelor sunt cele β-glicozidice (cu grupa OH glicozidică de la C_1 reprezentată deasupra planului ciclurilor în formulele perspectivice Haworth).

În cazul formulei conformaționale a glucopiranozelor, anomerul β al acestora se reprezintă cu grupa OH glicozidică în valență ecuatorială, în timp ce în anomerul α grupa OH glicozidică ocupă o valență axială. Aceasta explică de ce majoritatea glucidelor se găsesc în stare liberă în natură sub formă de anomer β mai stabil.

Apartenența monoglucidelor la seriile (famiile) sterice D şi L a fost stabilită în corelație cu aldehidele D şi L glicerice, considerate cele mai simple aldoze.



Aldehida D (+) glicerică



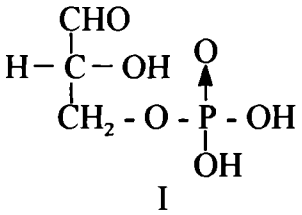
Aldehida L (-) glicerică

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

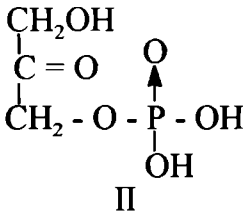
Un monoglucid va aparține seriei (familiei) sterice D sau L, după cum configuratia atomului de carbon asimetric cel mai depărtat de grupa carbonil este cea a aldehidei D-, respectiv L-glicerice.

I.1.1. Trioze

Acestea sunt considerate modelele cele mai simple ale monoglucidelor. Aldehida D glicerică şi dihidroxiacetona se găsesc în natură sub formă de 3-fosfo-D-gliceraldehidă (I) şi respectiv dihidroxiaceton-monofosfat (II):



I



II

Aceşti esteri ai acidului fosforic apar ca intermediari în procese biochimice ca: fotosinteza, fermentația alcoolică, glicoliza.

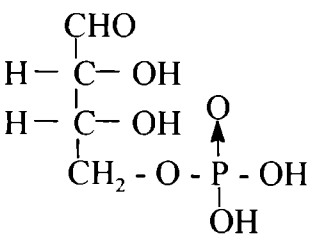
Dihidroxiaceton-monofosfatul (II) poate fi transformat în acid fosfatidic (fosfolipidă importantă pentru biogeneza trigliceridelor şi fosfogliceridelor), cu participarea unor reductaze NAD-dependente şi a acil-coenzimei A.

De asemenea, dihidroxiacetona poate rezulta ca produs finit printr-o reacție de oxidare biochimică a glicerinei, sub influența microorganismului Acetobacter xilinium. Se izolează din produsul de reactie sub formă de combinație bisulfitică insolubilă, care este descompusă ulterior prin acidulare, regenerându-se monoglucidul.

Pe de altă parte, printr-un proces catabolic, 3-fosfatul aldehidei D glicerice (I) contribuie la crearea legăturilor fosfat din molecula ATP bogată în energie şi la transferarea acestei energii la nivelul celulelor, pentru desfăşurarea proceselor biochimice specifice.

I.1.2. Tetroze

Singurul derivat natural din această categorie este D-eritrozo-4-fosfatul (III), intermediar în fotosinteză:



III

De asemenea, compusul III mai participă împreună cu acidul fosfoenol-piruvic la un proces de biosinteză a unor aminoacizi esențiali (fenilalanină şi triptofan) din bacterii şi plantele superioare.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

I.1.3. Pentoze

În cazul aldopentozelor, unele cicluri de cinci atomi (furanozice) sunt mai stabile decât ciclurile de şase atomi (piranozice). Glucidele în molecula cărora o grupă OH este înlocuită cu un atom de hidrogen sunt denumite prin sufixul "deoxi".

În stare liberă, pentozele apar în cantităţi mici în natură; derivaţii lor sunt însă mult mai răspândiţi, în special în regnul vegetal.

Pentozele şi derivaţii lor îndeplinesc în organismele vii diverse funcţii:

-constituie unităţi structurale ale poliglucidelor denumite pentozani (xilani, arabani etc.);

-intră în componenţa unor biomolecule importante (proteine, acizi nucleici) sau a altor compuşi de interes biochimic ridicat (nucleotide, glicozizi, coenzime, vitamine, antibiotice).

Pentozele sunt rezistente la acţiunea drojdiilor, dar pot fi degradate de unele microorganisme.

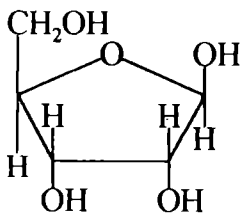
I.1.3.1. D-Riboza (IV) şi 2-deoxi-D-riboza (V): Aceste pentoze sunt constituente ale acizilor nucleici din celulele vegetale, animale şi microorganisme (D-riboza din ARN şi 2-D-deoxi-D-riboza din ADN).

Prin scindarea parţială a acizilor nucleici se obţin nucleotide, care conţin resturi de D-riboză şi 2-deoxi-D-riboză.

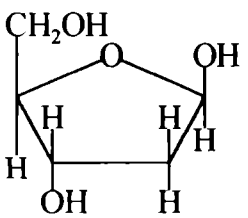
De asemenea, cele două pentoze sunt constituenţi ai unor vitamine (riboflavina, B12) ca şi a unor coenzime (ATP, NAD^+, $NADP^+$, FAD, coenzima A).

În organismele animale şi vegetale, D-riboza rezultă în procesele metabolice, sub formă de D-ribozo-5-fosfat.

O sursă naturală importantă de D-riboză şi 2- deoxi-D-riboză o reprezintă acizii nucleici din drojdie, din care se pot separa prin hidroliză chimică şi enzimatică.



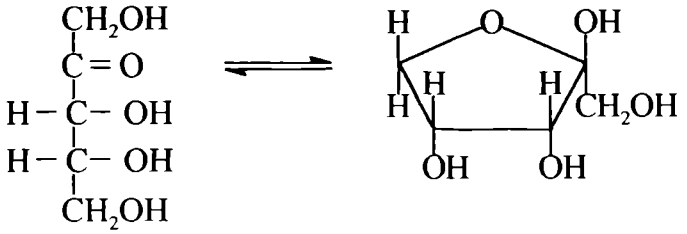
IV



V

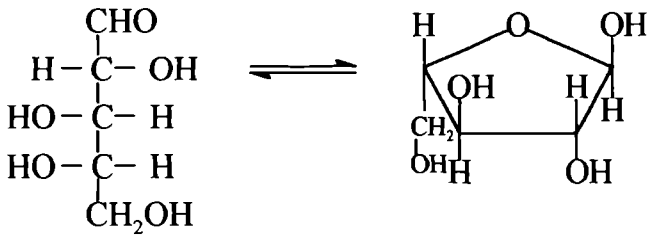
I.1.3.2. D-Ribuloza (VI): Este o cetopentoză, care rezultă sub formă de 5-fosfat al ribulozei şi de 1,5-difosfat, ca intermediari în fotosinteză.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



VI

I.1.3.3. L-Arabinoza (VII): Este componenta arabanilor din regnul vegetal, care se întâlnesc în hemiceluloză, mucilagii, gume vegetale, materii pectice şi în poliglucide bacteriene. De asemenea, L-arabinoza se mai găseşte şi sub formă de glicozizi naturali.



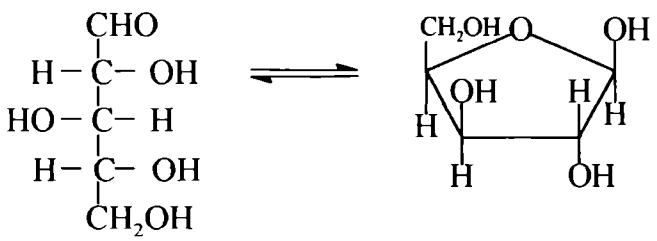
VII

În sucurile de fructe şi în lemnul coniferelor apar cantităţi mici de L-arabinoză, rezultată prin hidroliza acidă a arabanilor.

L-arabinoza se mai găseşte şi în hidrolizatele unor materiale bogate în arabani (gumă de vişin sau piersic, secară, tărâţe de grâu, pulpa epuizată a sfeclei de zahăr).

Această pentoză este metabolizată de organismul animal, fiind eliminată prin urină.

I.1.3.4. D-Xiloza (VIII): Apare în cantităţi mici în stare liberă, în plante. În schimb, este prezentă în cantităţi considerabile în poliglucidele xilani din cocenii de porumb, nuci, lemn, coji de seminţe etc.



VIII

Xilanii însoţesc celuloza din paie şi lemn, în care sunt conţinuţi în proporţie de 10-30% şi din care se separă prin extracţie cu soluţii alcaline.

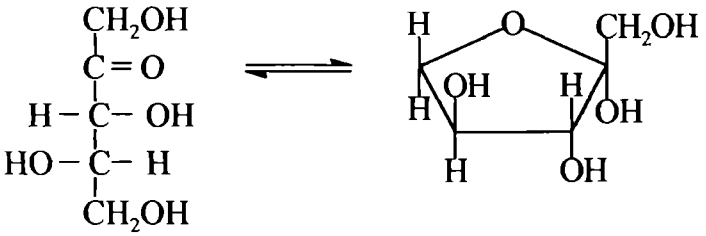
Xiloza nu este un factor nutritiv pentru animale şi nu este fermentată de drojdiile obişnuite. Unele bacterii sau drojdii o pot însă fermenta, rezultând produşi de reacţie utili. Astfel, fermentată cu unele tulpini de Lactobacillus, xiloza conduce la acid lactic şi acid acetic, cu randament de aprox. 90%.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Hidrolizatele de coceni de porumb sau de paie, fermentate cu drojdii (Torula şi Monilia) conduc la obtinerea unui material nutritiv pentru animale.

În biochimia clinică, dozarea pentozelor are drept scop explorarea absorbției intestinale prin testul D-xilozei, ca şi diagnosticarea pentozurei.

I.1.3.5. L-Xiluloza (IX): Este o cetopentoză prezentă în regnul vegetal. Nu este metabolizată de organismul uman, care nu posedă xilitol-dehidrogenază. Se elimină prin urină (pentozurie); această dereglare metabolică non-patologică nu este însoțită de semne clinice.



IX

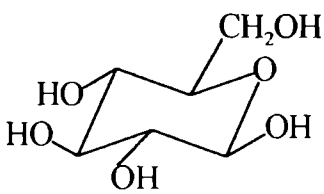
Este totuşi important să se identifice L-xiluloza în urină, pentru a se evita o confuzie cu diabetul zaharat. În acest scop, se foloseşte cromatografia de gaze sau în strat subțire.

I.1.4. Hexoze

În natură, hexozele reprezintă clasa cea mai răspândită de monoglucide. Ele se găsesc fie în stare liberă, fie sub formă de derivați (glicozizi, esteri, deoxiglucide, aminoglucide, antibiotice etc.) sau sub formă de componente ale majorității oligo- şi poliglucidelor din regnurile vii.

I.1.4.1. D-Glucoza: D-Glucoza (dextroza, zahărul de struguri) se găseşte sub formă liberă în toate organele plantelor, mai ales în fructe coapte, în miere de albine, sucuri de plante, dar şi în lichide biologice animale (sânge, limfă, urină, lichid cerebrospinal etc.). Uneori este însoțită de alte hexoze, în special de fructoză.

Ca majoritatea hexozelor, D-glucoza există în stare liberă sub formă β-piranozică (X).



X

În plantele verzi, glucoza rezultă prin fotosinteză, fiind unul dintre substratele-cheie în metabolismul celular, în urma căruia se formează (prin reacții multisecvențiale complicate, cu consum de energie) lipide, poliglucide şi proteine specifice.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

De asemenea, glucoza poate rezulta prin scindarea enzimatică a unor derivați naturali ai săi (glicozizi, aminoglucide, oligo- şi poliglucide) sub influenta unor hidrolaze specifice (α şi β-glucozidaza, celulazele, chitinaza, glucoamilaza etc.), răspândite atât în regnul vegetal cât şi în cel animal.

În organismele animale, glucoza poate fi de proveniență endogenă sau exogenă. Pe cale exogenă, hexoza este introdusă în organism odată cu alimentele, fie în stare liberă, fie sub formă de derivați. Pe cale endogenă, se formează prin biosinteză la nivelul ficatului, în urma epimerizării manozei, galactozei şi fructozei, sau din unii precursori ca: acidul lactic, unii aminoacizi şi alți intermediari metabolici.

Odată sintetizată, glucoza este transportată pe cale sanguină la țesuturile şi celulele organismului, unde suferă o serie de transformări metabolice.

Concentrația glucozei în sânge (glicemia) este controlată în principal de insulină, hormon secretat de pancreasul endocrin, care determină descompunerea glucozei din sânge şi țesuturi. Când secreția de insulină este absentă sau insuficientă, glucoza nu mai poate fi descompusă şi se acumulează în sânge peste limitele normale (1,5-1,8g‰), determinând hiperglicemia. Glucoza în exces este eliminată prin urină, determinând apariția glucozuriei. Acest fenomen se întâlneşte în diabetul zaharat.

Dacă, din contra, secreția de insulină depăşeşte nivelul normal, apare hipoglicemia (glucoza din sânge scade sub nivelul normal).

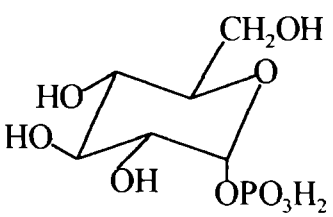
Atât hiper- cât şi hipoglicemia provoacă grave tulburări metabolice.

Prin frecvența şi răspândirea sa în natură, ca şi prin procesele metabolice în care este implicată, D-glucoza este cel mai important monoglucid, fără de care existența regnurilor vii nu ar fi posibilă.

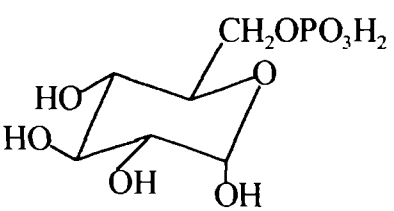
I.1.4.2. Derivați ai glucozei: În cele ce urmează, va fi prezentată o serie de derivați mai importanți ai glucozei, din punct de vedere biochimic; aceşti derivați, prezenți în natură, se formează ca rezultat al reacționabilității chimice a celor două tipuri de grupe funcționale din molecula glucozei (OH alcoolic şi -CHO).

A.Esterii fosforici ai D-glucozei apar în procesele metabolice de biogeneză şi biodegradare sau ca rezultat al transformărilor biochimice ale glucozei.

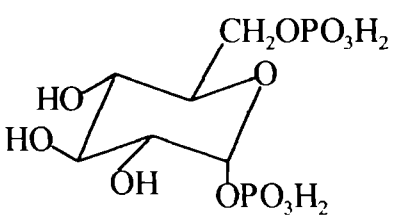
Esterul lui Cori (XI) - glucozo-1-fosfatul, esterul lui Robinson (XII) - glucozo-6-fosfatul şi glucozo-1,6-difosfatul (XIII) participă separat sau împreună la procese biochimice fundamentale.



XI



XII

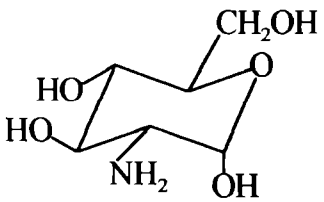


XIII

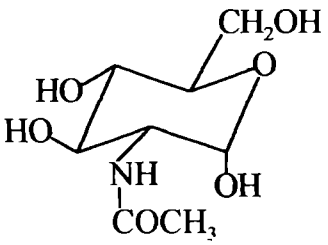
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Asemenea procese sunt: biosinteza diglucidelor, a poliglucidelor şi a unor glicozizi, fermentaţia alcoolică, glicoliza, glicogenoliza etc.

B.D-Glucozamina (chitosamina, 2-amino-2-deoxi-D-glucoza XIV) este componentul principal al chitinei (poliglucidul structural din crusta rezistentă a insectelor, crustaceelor, moluştelor etc.), în care se găseşte sub formă N-acetilată (XV), adică N-acetil-D-glucozamina.



XIV

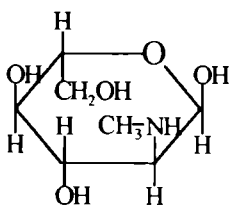


XV

N-Acetil-D-glucozamina (XV) mai intră şi în componenţa multor heteropoliglucide din ţesuturile vertebratelor (acidul hialuronic) ca şi în cea a unor glicosfingolipide din suprafeţele celulare ale ţesuturilor animale, în peptidoglicanul mureina şi în acizii teiconici din pereţii celulelor bacteriene.

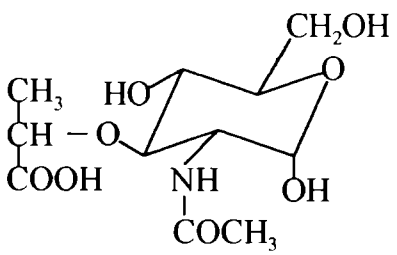
În heteropoliglucida heparină (din ţesuturile şi lichidele mamiferelor), care are proprietăţi anticoagulante, unitatea structurală este D-glucozamino-2,6-disulfatul, iar în keratansulfatul din cornee - N-acetil-D-glucozamino-6-sulfatul.

N-metil-L-glucozamina (XVI) este unul dintre cei trei componenţi ai streptomicinei, antibioticul produs de Streptomices griseus, cu acţiune bacteriostatică asupra unor germeni patogeni, printre care şi bacilul tuberculozei.



XVI

Acidul N-acetilmuramic (XVII) este un derivat al N-acetil-D-glucozaminei, eterificat la grupa hidroxilică din poziţia 3 cu acid D-lactic.



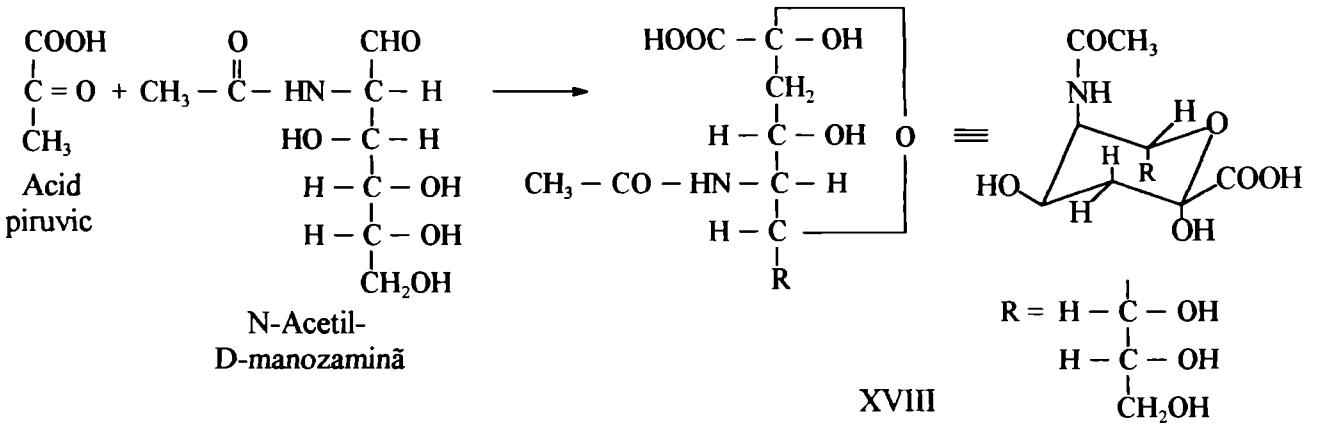
XVII

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ BUCUREŞTI

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Acizii sialici reprezintă denumirea generică a acidului N-acetil-neuraminic şi a derivaţilor săi. Astfel, un aminoglucid derivat de la N-acetil-manozamină şi acid piruvic (XVIII) este un constituent important al glicoproteinelor şi glicolipidelor din pereţii celulari ai bacteriilor şi ai ţesuturilor animale.

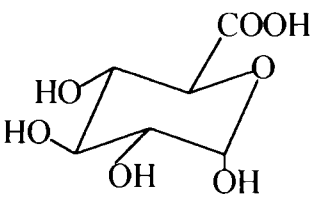
Acest aminoglucid, denumit şi acidul N-acetilneuraminic ia naştere probabil din condensarea aldolică a N-acetilmanozaminei cu acidul piruvic:



Unii acizi sialici conţin, în loc de grupe N-acetil, grupe N-glicolil ($>N-CO-CH_2OH$).

În mucopoliglucide, resturile de acizi sialici se leagă de alte componente prin legături glicozidice, implicând grupa OH de la C1 din restul de aminoglucid.

C.Acidul D-glucuronic (XIX) este prezent în mulţi compuşi de importanţă biologică, fie ca precursor al acestora, fie în unele funcţii fiziologice.

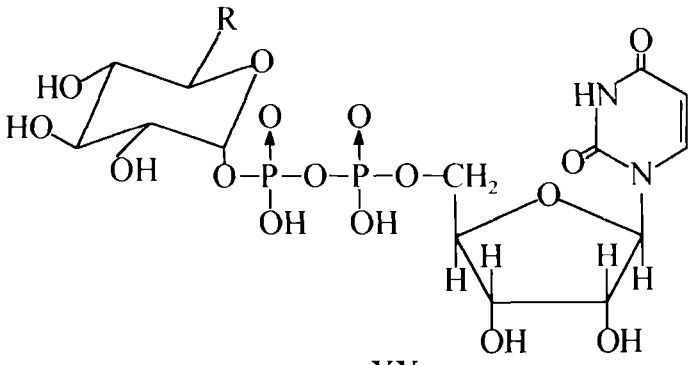


XIX

Astfel, acidul D-glucuronic este constituent al mucopoliglucidelor din învelişul celular al organismelor superioare (acidul hialuronic, condroitin-sulfaţii, heparina, gumele vegetale). Împreună cu β-D-glucoza, formează resturile monoglucidice constitutive din heteropoliglucidele bacteriene.

Sub formă de acid uridindifosfat-D-glucuronic (XX) este precursor în biosinteza unor poliglucide.

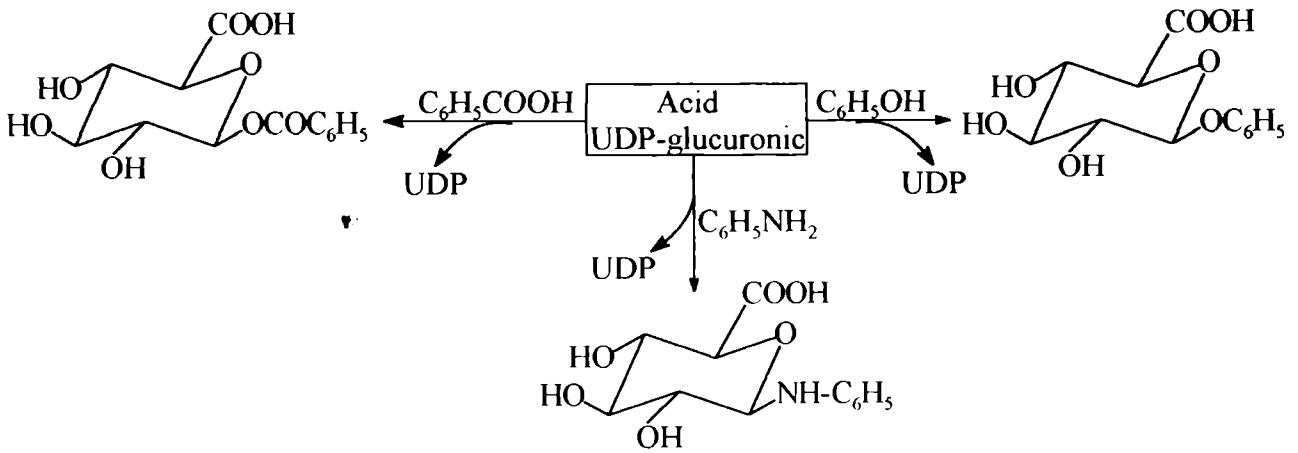
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



XX

R= – CH_2OH (în UDP - glucoză)
– COOH (în acid UDP - glucuronic)

Acidul UDP-glucuronic joacă un rol de donor de rest glucuronic spre molecule acceptoare ca: acidul benzoic, fenolii, aminele (toxice pentru organism), cu care formează derivați glucozidici, denumiți glucuronide.



Pe această cale are loc detoxifierea organismului, glucuronidele formate fiind eliminate prin excreție.

D.Glicozizi naturali

Numeroşi produşi naturali din regnul vegetal sunt formați dintr-un rest de glucid (o mono- sau diglucidă) eterificat la grupa OH glicozidică cu un aglicon.

Agliconul este componenta neglucidică a glicozizilor. El poate fi un compus cu grupe hidroxi (alcooli, fenoli, cianhidrine, coloranții din flori etc.). La hidroliza acidă sau enzimatică, glicozizii conduc la glucida şi agliconul din care sunt formați.

Cel mai frecvent glucid din glicozizii naturali este D-glucoza. Se mai întâlnesc în aceşti compuşi şi resturi de: L-ramnoză, D-galactoză, D-fucoză, unele pentoze şi diglucide ca: gențiobioza şi rutinoza.

Un conținut ridicat de glicozizi (sau glicozide) se întâlneşte în coaja arborilor şi în semințele unor plante (fanerogame).

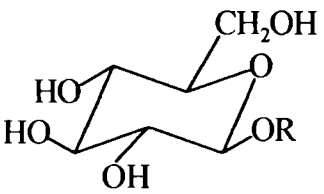
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Glicozizii naturali au un gust amar; mulți dintre ei sunt toxici sau au o activitate fiziologică specifică. Ca structură, aceşti compuşi sunt aproape în totalitate β-glicozizi.

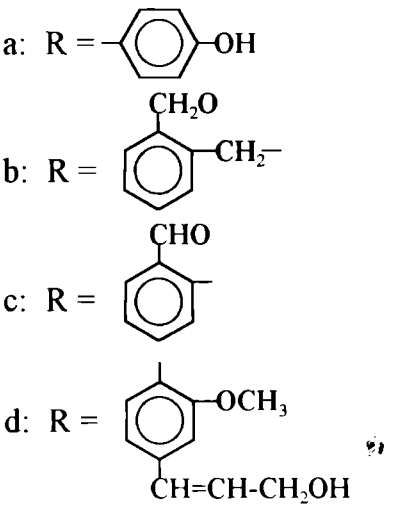
Plantele care conțin glicozizi posedă şi enzimele specifice, care le pot hidroliza, dar nu apar împreună în aceeaşi celulă. Numai când celulele sunt sfărâmate şi amestecate sau în unele stadii de dezvoltare a plantei, glicozizii şi hidrolazele lor specifice vin în contact direct.

1° Glicozizii fenolilor (XXI) conțin ca aglicon un fenol, un alcool alchil-aromatic, o hidroxibenzaldehidă etc.

•Astfel, arbutina (XXIa) conținută în scoarța, frunzele şi învelişul fructelor părului este β-glicozidul hidrochinonei.



XXI



Prezența arbutinei în cantități mari în frunzele părului este cauza înnegririi acestora toamna, datorită oxidării agliconului (hidrochinona) rezultat prin hidroliza glicozidului. Produşii de oxidare în aer, sub influența radiațiilor ultraviolete, sunt de culoare neagră.

•Salicina (XXIb) este β-D-glicozidul alcoolului salicilic. Se găseşte în frunzele şi coaja salciei (salix helix).

•Helicina (XXIc) este β-D-glicozidul salicil-aldehidei şi se găseşte în creţuşcă (Spirea ulmaria).

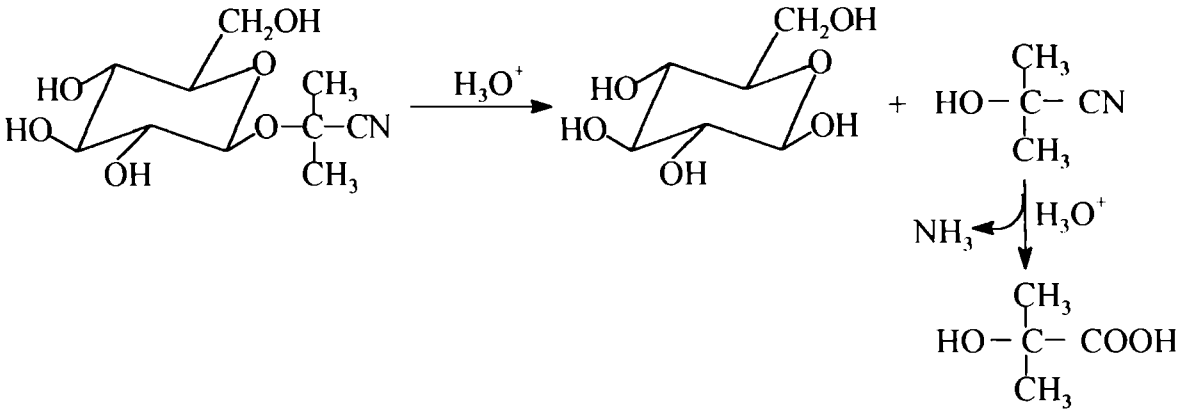
•Coniferina (XXId) a fost izolată din sucul cambial al coniferelor şi din sparanghel. Are drept aglicon alcoolul coniferilic.

2°Fitosterolii, glicozidele cardiace şi saponinele sunt agliconi ai unor glicozide naturale.

3°Glicozidele cianhidrinelor conduc uneori prin hidroliză enzimatică la acid cianhidric.

•*Linamarina* (din in - Linum usitatissimum - şi din arborele de cauciuc - Hevea brasiliensis) este β-D-glicozidul cianhidrinei acetonei; la hidroliză acidă conduce la β-D-glucoză şi acid α-hidroxi-izobutiric:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



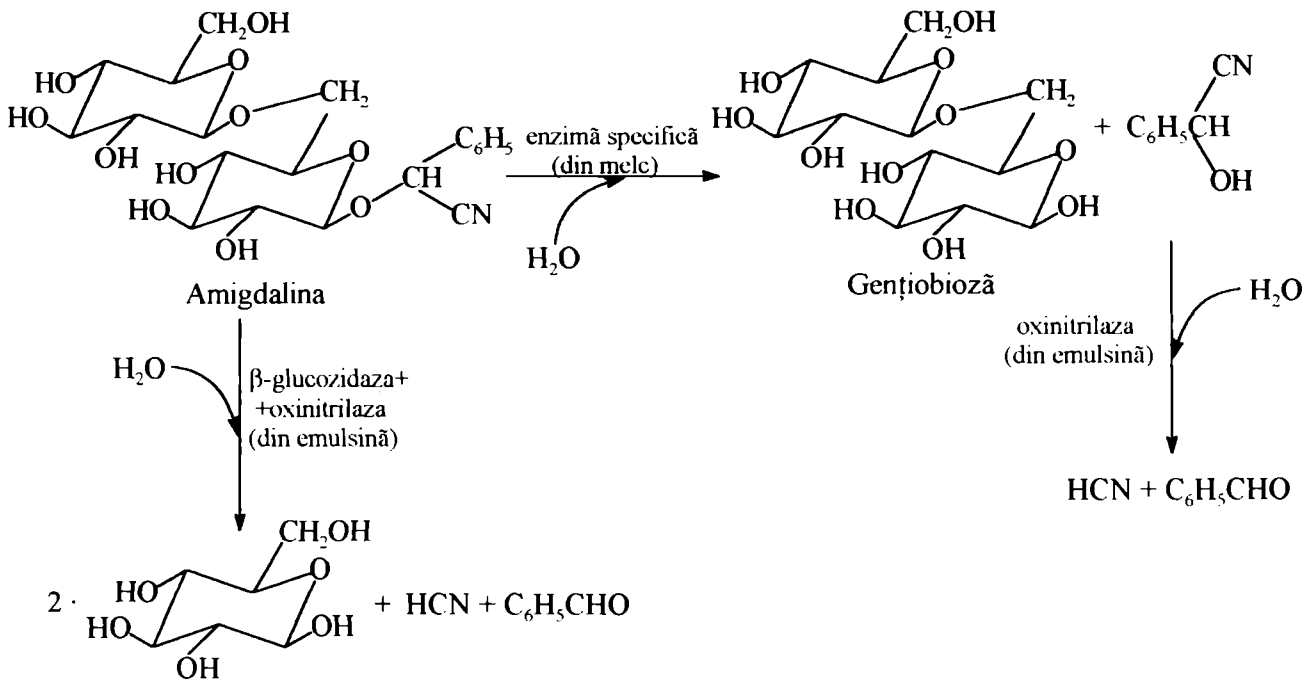
•*Amigdalina* este prezentă în cantități considerabile în migdalele amare, ca şi în sâmburii de piersic, cireş, prun, zarzăr, cais etc. Conține ca aglicon cianhidrina benzaldehidei.

La hidroliză acidă formează două molecule de β-D-glucoză, una de benzaldehidă şi una de acid cianhidric.

Hidroliza enzimatică cu emulsina prezentă în produsele naturale care conțin amigdalină conduce la acelaşi rezultat. Emulsina este un amestec de enzime, în care predomină β-D-glucozidaza.

O altă enzimă, conținută în tubul digestiv al melcului, hidrolizează amigdalina la o moleculă de gențiobioză (diglucid) şi una de nitril mandelic.

Sub influența altei enzime, care se găseşte în emulsină (oxinitrilaza), nitrilul mandelic se scindează în acid cianhidric şi benzaldehidă.

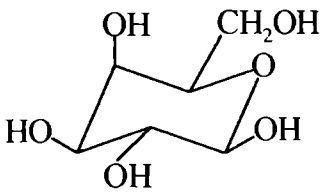


Eliberarea de HCN în urma hidrolizei enzimatice a amigdalinei este cauza intoxicațiilor apărute în urma ingerării unei mari cantități de sâmburi care conțin glicozidul (în special de zarzăr, prun şi migdale amare, în care acesta este prezent în concentrații ridicate).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

4°Glicozizii care conțin azot sunt substanțe care au în componență azot legat la atomul C_1 din restul de monoglucid. Asemenea glicozizi au o importanță fiziologică excepțională. Este cazul acizilor nucleici şi nucleotidelor N-nu se leagă direct de C_1, care vor fi tratați în capitole distincte ale acestei cărți.

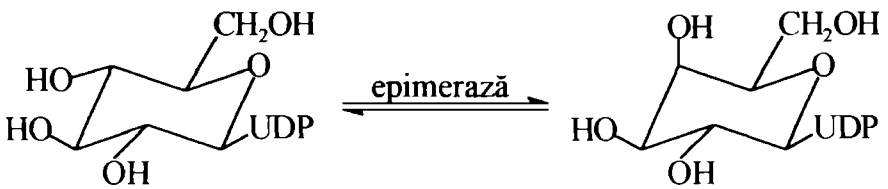
I.1.4.3. D-Galactoza (XXII) este o aldohexoză nefermentabilă întâlnită în mici cantități în organismele vii. Este prezentă în plasmele şi urinele normale. Dozarea sa este utilizată pentru diagnosticarea galactozemiei congenitale şi în explorarea funcțiilor hepatice.



XXII

Concentrațiile plasmatice normale ale D-galactozei sunt cuprinse între 0,05 şi 0,2 mmoli/l la adulți şi de 0,6 mmoli/l la nou-născuți.

În organismul animal, D-galactoza apare prin conversia (epimerizarea) D-glucozei la nivelul ficatului (galactoză endogenă). Această reacție este reversibilă şi are loc sub influența unei epimeraze specifice; interconversia celor două aldohexoze are loc numai sub forma uridinfosfaților corespunzători.



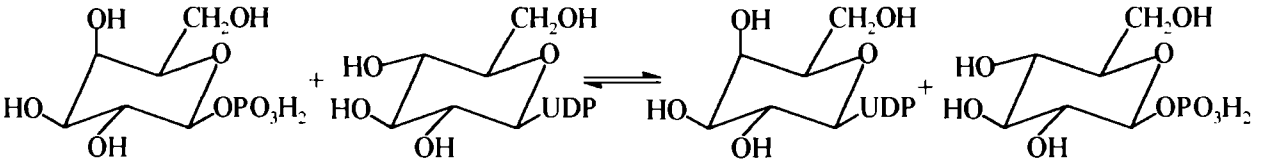
UDP - D-glucoză UDP - D-galactoză

Echilibrul poate fi deplasat într-un sens sau altul, în funcție de cerințele momentane ale organismului.

Uridindifosfat-D-galactoza, ca formă activă a galactozei endogene, serveşte în continuare la biosinteza unor mucopoliglucide, galactolipide etc., iar în cazul femeilor care alăptează participă la biosinteza lactozei.

D-Galactoza exogenă este ingerată o dată cu alimentele. În ficat, ea este transformată în D-glucoză, prin fosforilare cu ATP, în prezența galactokinazei. D-galactozo-1-fosfatul rezultat reacționează cu UDP-D-glucoza printr-un transfer de grupe între cele două substrate, cu participarea D-galactozo-1-fosfaturidil-transferazei:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



D-Galactozo-1-fosfat UDP-D-Glucozã UDP-D-Galactozã D-Glucozo-1-fosfat

Deficiența ereditară a uneia sau a ambelor enzime (galactokinaza şi galactozo-1-fosfaturidil-transferaza) este întâlnită la copiii mici, la care apare galactozemia (imposibilitatea metabolizării galactozei din lapte), afecțiune întâlnită în special la populațiile din Orientul Mijlociu.

În această situație, galactoza şi galactozo-1-fosfatul se acumulează în organism, conducând la leziuni hepatice şi nervoase şi determinând apariția cataractei.

D-Galactoza este şi o componentă a altor compuşi naturali importanți ca structură şi funcții biologice: lactoza, rafinoza, stahioza (oligoglucide), lipide complexe (cerebrozide, gangliozide), glicoproteine, mucopoliglucide, acidul ungulic (din epiderma umană, unghii, păr, copite de cal şi bou etc.).

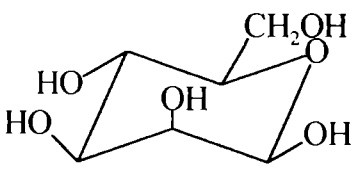
Derivații funcționali ai galactozei, ca acidul D-galacturonic şi N-acetil-D-galactozamina, sunt componenți ai unor substanțe cu structură complexă, printre care şi unele poliuronide din plante (acidul pectic). Anhidro-D-galactoza şi anhidro-L-galactoza, ca şi D-galactozo-4-sulfatul intră în compoziția unor heteropoliglucide din alge (agar, k-carageenan etc.).

Calea uzuală de obținere a unor cantități mari de D-galactoză este hidroliza acidă sau enzimatică a lactozei din zerul separat după coagularea brânzeturilor din lapte.

Lactoza din zer se hidrolizează cu culturi de microorganisme conținând β-galactozidază (Sacharomyces lactis din drojdii sau bacteria Escherichia coli). Se obține un amestec echimolecular de D-glucoză şi D-galactoză, cu proprietăți edulcorante superioare lactozei.

Varietăți de lapte dietetic destinate alimentației copiilor care suferă de forma de galactozemie determinată de absența ereditară a lactazei se obțin prin prelucrarea laptelui integral cu microorganisme (drojdii), care conțin β-galactozidază.

I.1.4.4. D-Manoza (XXIII) se găseşte în cantități foarte mici în stare liberă. Prezența sa în mere şi piersici a fost determinată cromatografic.



XXIII

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În cantități apreciabile, D-manoza se găseşte sub formă legată, în homopoliglucidele (manani) din bacterii, drojdii, ciuperci, plante superioare, ca şi în serumglobuline şi în ovomucoid.

Esterii fosforici cu importanță biologică ai D-manozei sunt: D-manozo-1-fosfatul, D-manozo-6-fosfatul, D-manozo-1,6-difosfatul. În ficat, D-manoza este epimerizată la D-glucoză endogenă. D-Manoza este fermentată de drojdii.

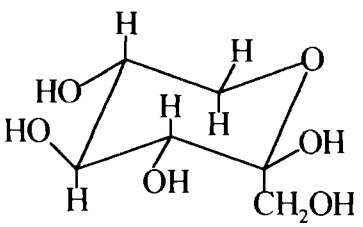
Cea mai bogată sursă de manoză o reprezintă mananii din fructul palmierului sud-american Phytelephas macrocorpa (nuca de fideş, fildeş vegetal), din care se extrage prin hidroliză acidă.

Acidul D-manuronic este constituent al unor heteropoliglucide de natură vegetală, ca acidul alginic din speciile de alge brune Pheophyceae.

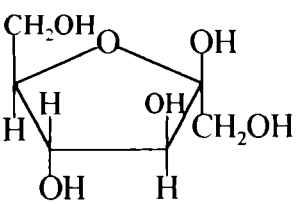
I.1.4.5. D-Fructoza (levuloza, zahărul din fructe) se găseşte în stare liberă în organe vegetale, alături de D-glucoză şi de zaharoză.

Cele mai mari cantități de D-fructoză sunt prezente în fructele dulci, tomate şi mierea de albine. De asemenea, fructoza este o componentă a unor oligoglucide (zaharoza, rafinoza, stahioza, genţiobioza) ca şi a inulinei (poliglucid din rădăcinile de cicoare, dalie, iarbă-mare, nap porcesc).

În stare liberă, D-fructoza adoptă o structură piranozică (XXIVa), în timp ce în oligo- şi poliglucide are o structură furanozică (XXIVb), care apare şi la metaboliții derivați ai monoglucidei.



XXIVa

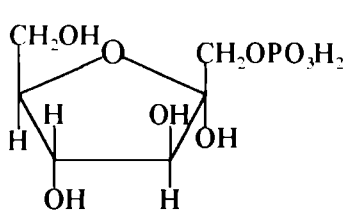


XXIVb

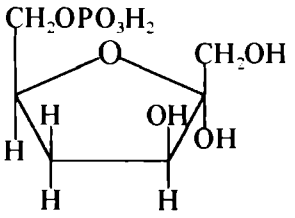
În regnul animal, D-fructoza apare în cantități mici în plasmă şi urină. Aceste concentrații sunt crescute în cazul fructozuriei esențiale şi al intoleranței ereditare la fructoză. Concentrațiile plasmatice normale sunt în jur de 0,2mmoli/l. Eliminarea urinară cotidiană normală este inferioară concentrației de 0,7mmoli/l.

Formele metabolice active ale fructozei sunt esterii fosforici: esterul lui Neuberg sau D-fructozo-1-fosfatul, D-fructozo-6-fosfatul şi esterul lui Harden-Young sau D-fructozo-1,6-difosfatul.

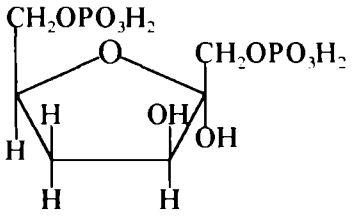
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



D-Fructozo-1-fosfatul



D-Fructozo-6-fosfatul



D-Fructozo-1,6-difosfatul

Având caracter acid, aceşti fosfaţi se prezintă ca săruri la pH fiziologic, jucând rolul de intermediari în metabolismul glucidic (fotosinteza, glicoliza, fermentaţia alcoolică, interconversia hexozelor).

La animale, fructoza exogenă provine din fructoza liberă şi oligoglucidele sau poliglucidele vegetale ingerate. Fructoza nu ajunge în circulaţia sistemică, deoarece este transformată în metaboliţi ai secvenţei Embden-Meyerhof în ficat şi în celulele mucoasei intestinale. Deficitul ereditar în enzime implicate în metabolismul fructozei conduce la maladii genetice.

Astfel, absenţa aldolazei (care catalizează scindarea D-fructozo-1-fosfatului în gliceraldehidă şi monofosfatul dihidroxi-acetonei) generează o intoleranţă ereditară la fructoză Acumularea de D-fructozo-1-fosfat netransformat în ficat inhibă D-glucozo-6-fosfataza, împiedicând eliberarea glucozei în circulaţie. Rezultatul este o hiperglicemie accentuată.

Altă maladie genetică este provocată de absenţa fructokinazei (care catalizează fosforilarea fructozei). Fructoza neconvertită într-o formă metabolică activă (fosfat) se acumulează în organism şi se elimină prin urină (fructozurie).

Un rol special revine fructozei în mobilitatea şi metabolismul spermatozoizilor, fapt pentru care în celulele seminale există o cale specifică de transformare (epimerizare) a glucozei în fructoză, prin reducerea D-glucozei la sorbitol, urmată de oxidarea enzimatică a acestuia.

O cantitate mai mare de fructoză se poate obţine industrial prin hidroliza enzimatică a zaharozei cu invertaza din drojdia de bere. Rezultă zahărul invertit, mai dulce decât zaharoza şi care împiedică cristalizarea în timp a produselor zaharoase (siropuri, jeleuri, bomboane, ciocolată etc.).

Epimerizarea enzimatică a D-glucozei este o sursă de obţinere a unor cantităţi mari de D-fructoză prin procedee bioindustriale.

Procesul are loc prin tratarea soluţiilor apoase de glucoză cu glucoizomeraza de origine microbiană. Rezultă un sirop cu conţinut înalt de fructoză (42%), cu cantităţi edulcorante superioare glucozei.

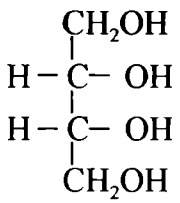
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

I.1.4.6. Alți derivați ai monoglucidelor, de importanță biochimică

A.Polialcooli derivați de la monoglucide

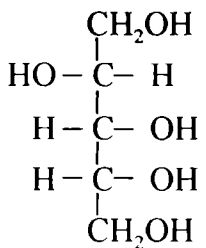
Aldozele se pot reduce cu $NaBH_4$, cu amalgam de sodiu sau de aluminiu sau cu hidrogen molecular în prezență de metale activate (Ni, Pd, Pt etc.), conducând la polialcooli. Aceştia se denumesc prin adăugarea sufixului "itol" la rădăcina numelui aldozei de la care provin. După numărul de grupe OH din moleculă, aceşti compuşi se clasifică în: tetritoli, pentitoli, hexitoli etc. În regnurile vii se găsesc mici cantități de astfel de polialcooli.

1°Tetritoli. Singurul care apare liber în natură, în alge şi ca ester al acidului orselic (acid 2-metil-4,6-dihidroxibenzoic) în fungi şi licheni, este mezo-eritrita:

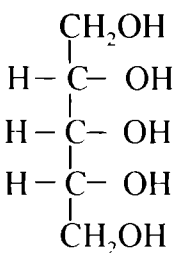


2°Pentitoli. Câțiva compuşi din această categorie apar în regnurile vii:

•*D-Arabitolul* se găseşte în unele ciuperci şi în ruşcuța primăvăratică (Adonis vernalis):



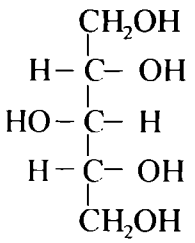
•*D-Ribitolul* este o componentă a vitaminei B_2 (riboflavina) răspândită atât în regnul vegetal (plante verzi) cât şi în cel animal (ficat, rinichi, ouă, lapte) ca şi în drojdia de bere:



De asemenea, D-ribitolul intră în compoziția flavin-coenzimelor (FAD din glucozoxidază).

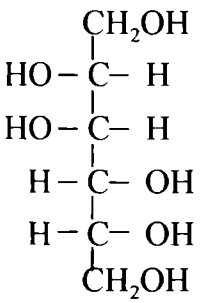
•*D-Xilitolul* este un edulcorant utilizat în fabricarea produselor de cofetărie "fără zahăr":

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



3°Hexitolii (hexitele) sunt răspândiți mai ales în regnul vegetal.

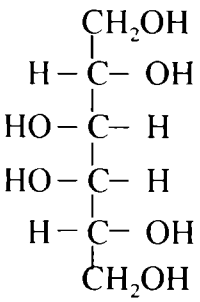
•*D-Manitolul* (D-manita) a fost izolat din mană, o exudație a arborelui Traxinus ornus. Se mai găseşte şi în unele specii de alge brune marine (Laminaria digitala), care conțin în timpul verii până la 37% în greutate produs uscat D-manită:



Se utilizează la fabricarea de răşini sintetice şi uleiuri sicative sintetice.

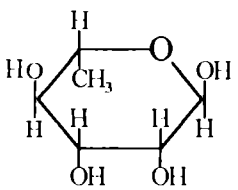
•*D-Sorbita* (D-sorbitol) se găseşte în fructe, în special cele din familia rozaceelor, genul sorbus (Sorbus aucuparia). Este intermediar în sinteza industrială a vitaminei C, în care se obține prin reducerea catalitică a D-glucozei anhidre.

•*Dulcita* se obține prin reducerea D-galactozei. Se găseşte în plante terestre şi în alge marine. Se utilizează în bacteriologie:

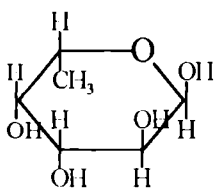


B.Monoglucide din seria sterică L şi derivați ai lor

1°α-L-Ramnoza şi α-L-fucoza sunt componente ale unor poliglucide naturale mai puțin răspândite:



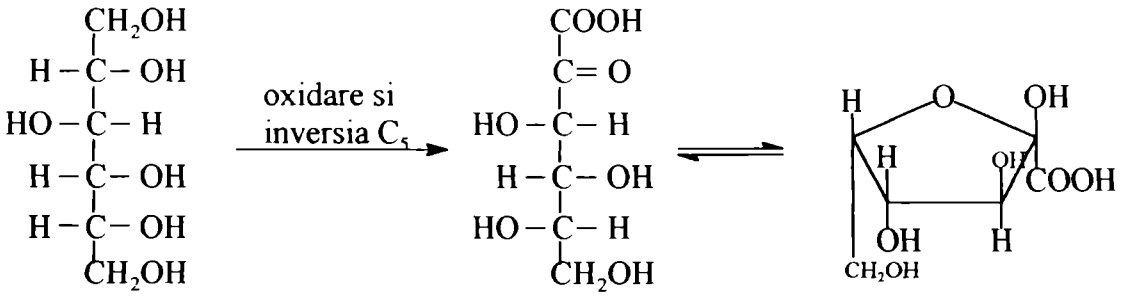
α-L-Ramnoza



α-L-Fucoza

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2°Acidul 2-ceto-L-gulonic (XXV) este intermediar în sinteza industrială a acidului L-ascorbic (vitamina C), în care rezultă prin oxidarea biochimică (cu Acetobacter suboxydans) a D-sorbitei:



XXV

3°Streptomicina este antibioticul izolat de Waksman în 1947 din Streptomices griseus, cu acțiune bacteriostatică asupra bacilului tuberculozei.

Streptomicina are formula moleculară $C_{21}H_{39}O_{12}N_7$ şi caracter bazic puternic.

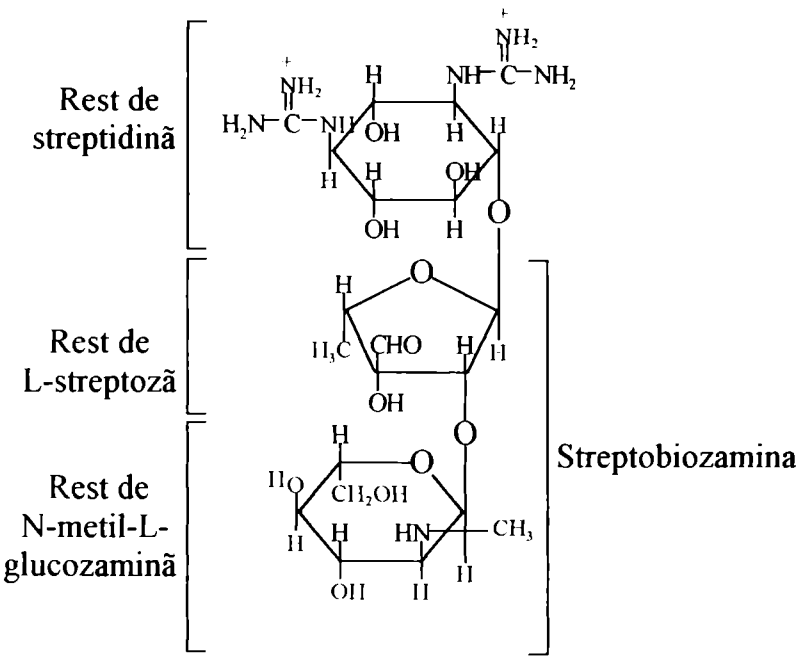
Molecula antibioticului este formată din trei substanțe cu structură diferită:

-streptidina (diguanidino-mezoinozitol);

-L-streptoza (3-C-formil-5-deoxi-L-hexoza) şi

-N-metil-L-glucozamina.

Ultimele două componente sunt legate sub forma unei diglucide (streptobiozamina):



Streptomicina

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

I.2. Oligoglucide

Cei mai răspândiți compuşi din această clasă sunt diglucidele (dizaharidele), numeroase dintre ele fiind de origine biologică.

La hidroliza enzimatică sau acidă, diglucidele se transformă în două molecule de monoglucide.

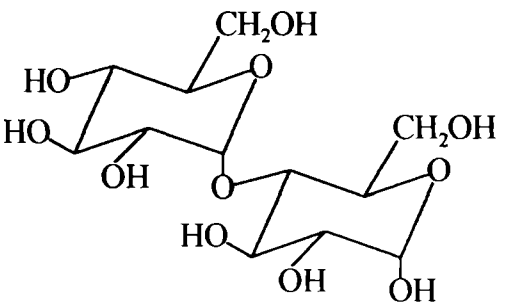
După natura legăturii dintre resturile de monoglucide, oligoglucidele se clasifică în:

-nereducătoare (cu legătură dicarbonilică); reprezentantul acestei clase este zaharoza şi

-reducătoare (cu legătură monocarbonilică): maltoza, celobioza, lactoza, genţiobioza etc.

I.2.1. Diglucide

I.2.1.1. Maltoza (XXVI) sau zahărul de malţ este formată din două resturi de D-glucopiranoză legate α-1,4-glicozidic.



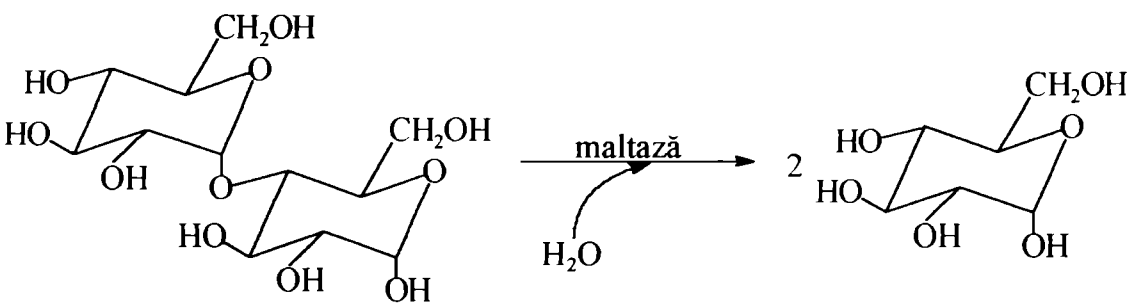
XXVI

Maltoza este rareori întâlnită în regnul vegetal, mai ales în ţesuturile plantelor bogate în amidon. În cantităţi mici, se găseşte şi în mierea de albine. Cantităţi ceva mai mari de maltoză sunt prezente în cartofi şi germenii de orz încolţit.

Maltoza este o componentă structurală de bază a amidonului şi glicogenului, D-glucani foarte răspândiţi in regnul vegetal şi, respectiv animal.

Prezenţa sa în stare liberă în plante se datorează scindării enzimatice a amidonului.

Sub influenţa maltazei (α-1,4-glucozidaza) din drojdie, maltoza este hidrolizată la D-glucoză:

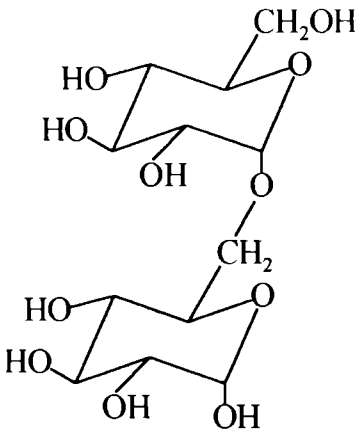


XXVI

Cantităţi însemnate de maltoză rezultă la hidroliza enzimatică a amidonului cu α şi β amilază.

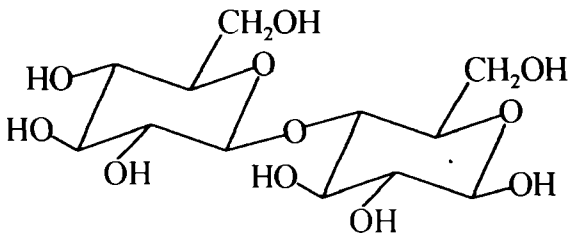
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Izomaltoza (XXVII) este izomerul α-1,6 al maltozei. Ea se formează prin endohidroliză din dextrinele rezultate de la amidon şi glicogen după hidroliza cu α-amilază. Enzima specifică pentru endohidroliza acestor dextrine este oligo-1,6-glucozidaza.



XXVII (Izomaltoza)

I.2.1.2. Celobioza (XXVIII) este alt stereoizomer al maltozei, format printr-o legătură 1,4-β-glicozidică între două resturi de D-glucopiranoză.



XXVIII

Celobioza nu există în stare liberă în natură, ea este constituentul structural de bază al celulozei, fiind prezentă şi în alte glucide din plante (laminaran, glicozizi etc.).

Diferența structurală dintre maltoză şi celobioză are o semnificație biologică deosebită.

Astfel, organismul uman neposedând echipamentul enzimatic necesar descompunerii hidrolitice a celobiozei la glucoză, celuloza nu poate fi folosită în alimentație.

În schimb, celuloza este un element esențial pentru rumegătoare, la care flora bacteriană din tubul digestiv poate produce enzimele necesare pentru metabolizarea sa.

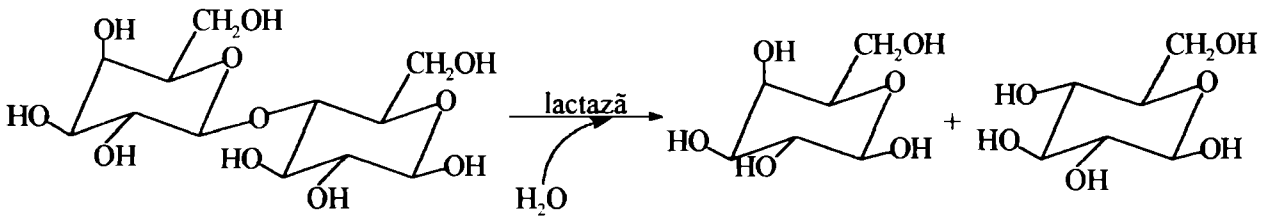
Celobioza se poate obține alături de alte oligoglucide (celotrioză, celotetroză) prin hidroliza acidă parțială a celulozei (Zechmeister).

Prin hidroliză cu acizi concentrați (HCl suprasaturat, H_2SO_4 conc.) sau enzimatică (cu β-1,4-glucozidaza din Trichoderma viridae), celobioza se transformă în β-D-glucopiranoză.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

I.2.1.3. Lactoza (XXIX) este diglucidul prezent în laptele mamiferelor, din care cauză a mai fost denumită şi zahăr de lapte. A mai fost identificată în urină, în staminele plantei Forsythia suspensa, ca şi în hidrolizatele saponinelor din Sapindus saponaria.

Cantitatea de lactoză din lapte depinde de specia de mamifere şi variază între limitele 1-8%. Lactoza are valoare alimentară pentru om şi mamifere, care posedă în intestinul subțire enzima specifică (lactaza sau β-galactozidaza), care catalizează hidroliza diglucidului la D-glucoză şi D-galactoză:



XXIX

La nivelul ficatului, galactoza rezultată prin acest proces de hidroliză este convertită enzimatic la D-glucoză endogenă. Glucoza rezultată din ambele reacții este utilizată de organism în procesele sale metabolice.

În mod normal, copiii posedă lactaza intestinală indispensabilă hidrolizei lactozei şi absorbției sale în sânge. Totuşi, unii adulți (şi copii), mai ales negrii şi orientalii, posedă un nivel redus al acestei enzime.

În consecință, cea mai mare parte a lactozei conținută în laptele băut trece netransformată prin tractul digestiv în colon. Aici, în urma fermentației bacteriene, se produc cantități mari de dioxid de carbon, hidrogen molecular şi acizi organici iritanți. Aceşti indivizi prezintă galactozemie (intoleranță la lapte).

Tehnologii recente au rezolvat această problemă, prin producerea pe cale biochimică a laptelui dietetic, în urma scindării lactozei din laptele integral cu β-galactozidază, în reactoare enzimatice.

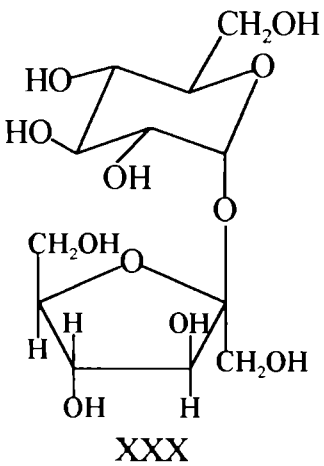
Lactoza nu este fermentată de drojdia de bere; unele microorganisme (Bacterium lactis acidi, Streptococcus lactis etc.) îi produc o fermentație lactică, iar unele ciuperci şi drojdii - o fermentație alcoolică. Zerul rezultat în industria brânzeturilor este o sursă bogată de lactoză. Înainte de prelucrare, zerul este tratat cu catalază, pentru îndepărtarea apei oxigenate folosite la pasteurizarea laptelui, după care este tratat cu β-galactozidază din Saccharomices lactis, Aspergillus niger sau Escherichia coli, care hidrolizează lactoza la D-glucoză şi D-galactoză.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

I.2.1.4. Zaharoza (XXX) este de departe diglucidul cel mai răspândit în regnul vegetal şi cel mai important din punct de vedere biochimic.

După sursele naturale din care se extrage, zaharoza a mai fost denumită şi zahăr de trestie sau zahăr de sfeclă.

Este un diglucid nereducător, format dintr-o moleculă de α-D-glucopiranoză şi una de β-D-fructofuranoză, legate 1,2-α,β-glicozidic:



XXX

Materia primă pentru extragerea industrială a zahărului o constituie tulpina trestiei de zahăr (cu 23-24% zaharoză) sau rădăcina sfeclei de zahăr (cu 16-20% continut în zaharoză).

După cum se observă din formula XXX, legătura dintre resturile de monozaharide din zaharoză este α-D-glucopiranozido-β-D-fructofuranozidică. De aceea, zaharoza poate fi scindată hidrolitic de două enzime: α-glucozidaza şi β-fructozidaza (invertaza).

Se obţine un amestec echimolecular de D-glucoză şi D-fructoză, denumit "zahăr invertit", deoarece semnul rotaţiei specifice al soluţiei apoase de zaharoză se modifică în urma invertirii:

$$\underset{[\alpha]_D^{20} = +60^o}{\text{Zaharoză}} \xrightarrow{H_2O} \underset{[\alpha]_D^{20} = -93^o}{\text{D-fructoză}} + \underset{[\alpha]_D^{20} = +52,5^o}{\text{D-glucoză}}$$

zahăr invertit
$[\alpha]_D^{20} = -40,5^o$

Biogeneza zaharozei are loc în frunzele plantelor, din produşii reacţiei de fotosinteză. După formare, zaharoza este transportată la diversele organe ale plantelor. Astfel, trestia de zahăr utilizează pentru biosinteza zaharozei glucoza si fructoza, printr-o succesiune de reacţii în care participă UDP-glucoza. Biosinteza zaharozei este prezentată sumar în fig. I.2.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

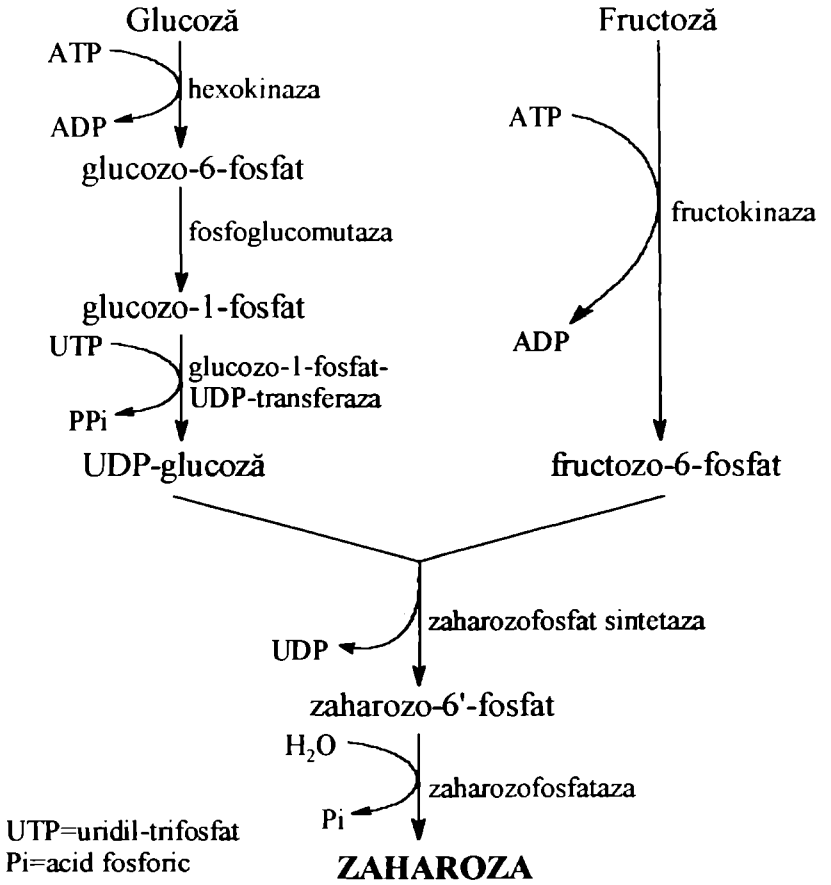
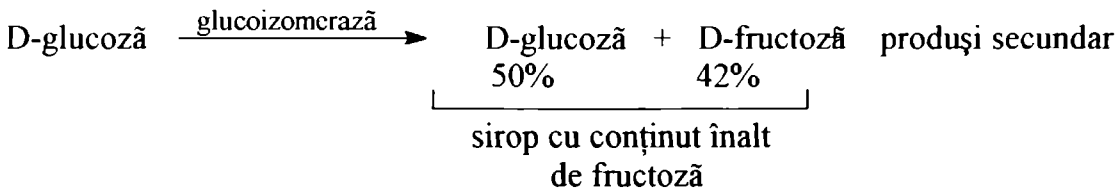


Fig. I.2 - Etapele principale ale biosintezei zaharozei

Zaharoza este o sursă energetică importantă pentru procesele metabolice ale țesuturilor animale şi o sursă de catene hidrocarbonate pentru biosinteza constituenților celulari. Acest diglucid are o valoare alimentară importantă pentru om şi animale, care posedă în tubul digestiv enzimele capabile de a scinda zaharoza în glucoză şi fructoză, componente esențiale ale circuitului metabolic.

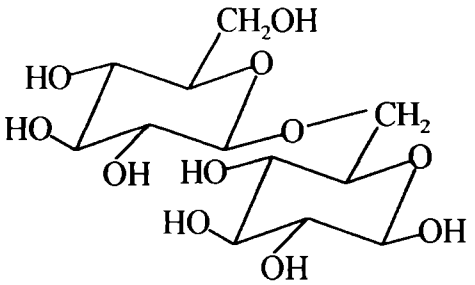
După cum s-a amintit, un sirop cu conținut înalt de fructoză şi proprietăți edulcorante asemănătoare cu cele ale zahărului invertit se obține industrial, prin epimerizarea glucozei cu glucoizomerază bacteriană:



Ca materie primă se utilizează siropul de glucoză, obținut prin hidroliza enzimatică a amidonului din porumb sau din cartof. Siropul cu conținut înalt de fructoză are o proprietate edulcorantă estimată la 70-75% din cea a zaharozei.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

I.2.1.5. Genţiobioza (XXXI) este diglucida din compoziţia glicozidului amigdalină, fiind formată din două molecule de D-glucopiranoză legate β-1,6-glicozidic:



XXXI

De asemenea, genţiobioza este şi o componentă a triglucidei genţianoza (XXXIII).

I.2.2. Triglucide

Triglucidele sunt formate din trei resturi de monoglucide legate prin legături eterice. Ca şi în cazul diglucidelor, la formarea acestor legături pot participa fie grupele -OH glicozidice, fie grupele -OH alcoolice din moleculele monoglucidelor componente.

În natură, triglucidele se găsesc în cantităţi mici, în regnul vegetal. Ele mai pot fi componente ale unor poliglucide, din care rezultă prin hidroliză. În fine, triglucide se pot obţine prin sinteze de laborator (chimice sau biochimice).

1.2.2.1. Rafinoza (XXXII) este nereducătoare; prin hidroliză acidă, se transformă în D-galactoză, D-glucoză şi D-fructoză (1:1:1).

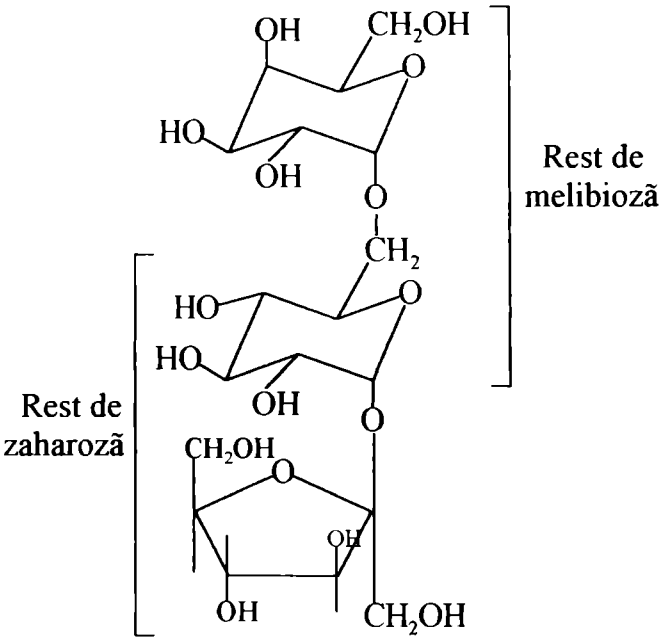
Rafinoza se găseşte în sfeclă şi în seminţele de bumbac şi este conţinută şi în melasa rezultată la fabricarea zahărului de sfeclă.

Din făina boabelor de bumbac, rafinoza se extrage cu apă, după care se precipită cu hidroxid de calciu sau de bariu, sub formă de săruri insolubile; acestea se izolează şi se descompun pentru obţinerea triglucidei libere.

Dacă în melasă rafinoza se acumulează până la concentraţii de 4%, izolându-se prin cristalizare, în sfecla de zahăr rafinoza este conţinută în cantităţi mult mai mici (sub 0,05%).

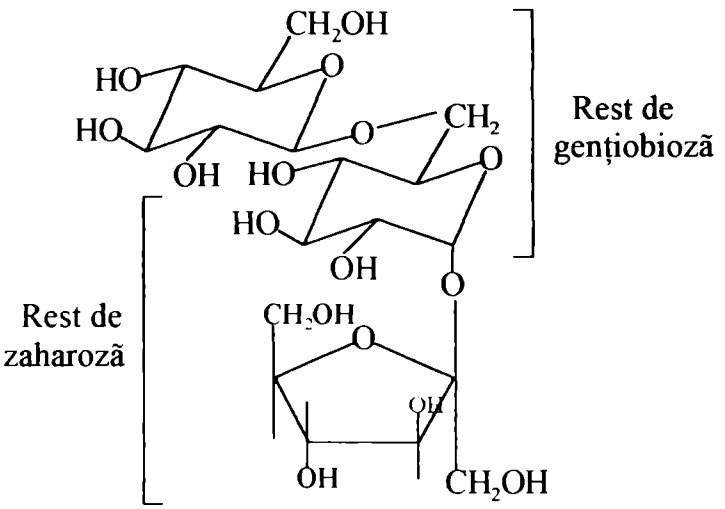
Rafinoza este o triglucidă nereducătoare şi este scindată de două enzime: invertaza din drojdie (rezultă D-fructoză şi diglucida melibioză) şi α-galactozidaza din emulsină (rezultă zaharoză şi D-galactoză).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



XXXII

I.2.2.2. Genţianoza (XXXIII) este nereducătoare; se găseşte în rizomii unor specii de genţiană, ca glucid de rezervă, din care se extrage cu etanol 90%.



XXXIII

Prin hidroliză acidă, genţianoza este scindată la două molecule de D-glucoză şi o moleculă de D-fructoză.

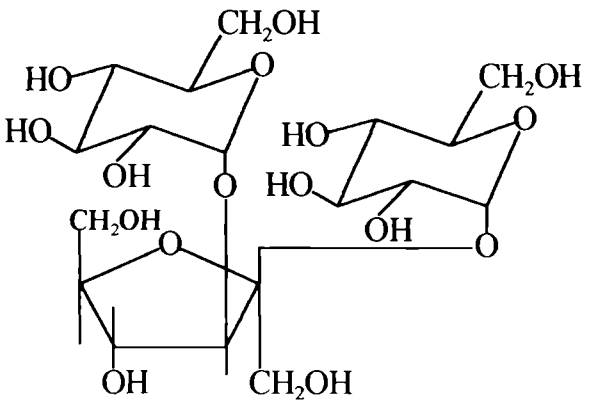
Acest triglucid este hidrolizat sub acţiunea a două enzime: invertaza (conduce la genţiobioză şi fructoză) şi 1,6-β-glucozidaza din emulsină (rezultă D-glucoză şi zaharoză).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

I.2.2.3. Melicitoza (XXXIV) a fost identificată în mana şi exudatele multor plante. Cel mai bogat conținut în melicitoză (până la 40%) îl au frunzele de plop şi de tei. Pe timp de secetă, în lipsa unei cantități suficiente de nectar, melicitoza se acumulează în mierea de albine. Acest fenomen poate provoca cristalizarea mierii în faguri.

Fiind rezistentă la acțiunea invertazei, melicitoza nu constituie un factor nutritiv pentru albine.

Melicitoza este un triglucid nederucător, format din două resturi de D-glucoză şi unul de D-fructoză.



XXXIV

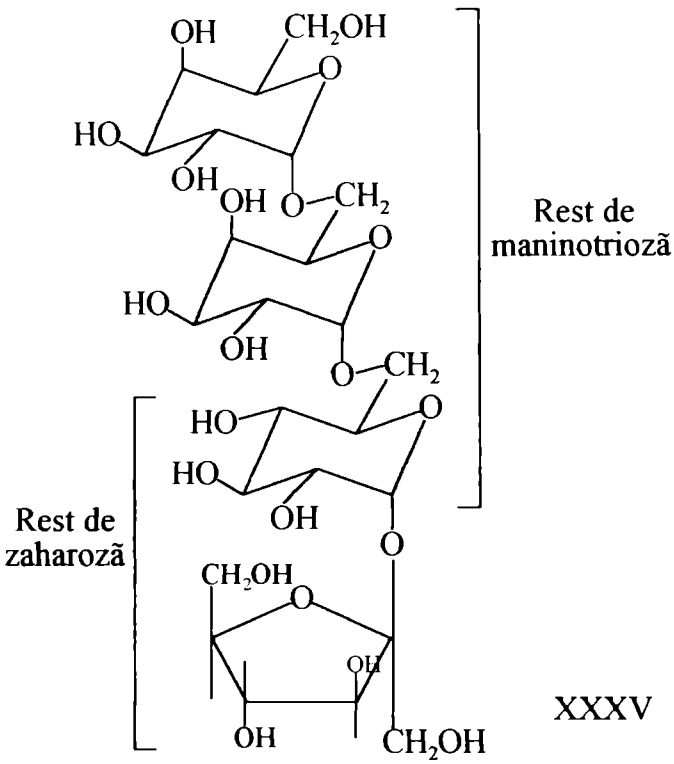
După cum se observă din structura melicitozei, aceasta conține un rest de D-fructoză legat cu o moleculă de glucoză printr-o legătură α-1,3-glucozidică şi cu cea de a doua moleculă de glucoză, printr-o legătură β-2-fructo-α-1-glucozidică (ca în molecula zaharozei).

I.2.3. Tetraglucide

Stahioza (XXXV) este singura tetraglucidă existentă în stare liberă în natură; se găseşte în soia, trifoi roşu şi măzăriche. Este nereducătoare, iar la hidroliza acidă totală conduce la doi moli de D-galactoză, un mol de D-glucoză şi un mol de D-fructoză.

Prin hidroliză cu invertază, stahioza se transformă în D-fructoză şi un trizaharid reducător, denumit maninotrioza, iar prin hidroliza tetraglucidei cu α-galactozidaza se obtin doi moli de D-galactoză şi un mol de zaharoză.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



XXXV

I.2.4. Hexaglucide

Ajugona (XXXVI) este o hexaglucidă formată din patru molecule de D-galactopiranoză, una de D-glucopiranoză şi una de D-fructofuranoză (acestea două din urmă formând un rest de zaharoză).

Se deosebeşte de stahioză printr-un număr mai mare (cu 2) de molecule de D-galactoză.

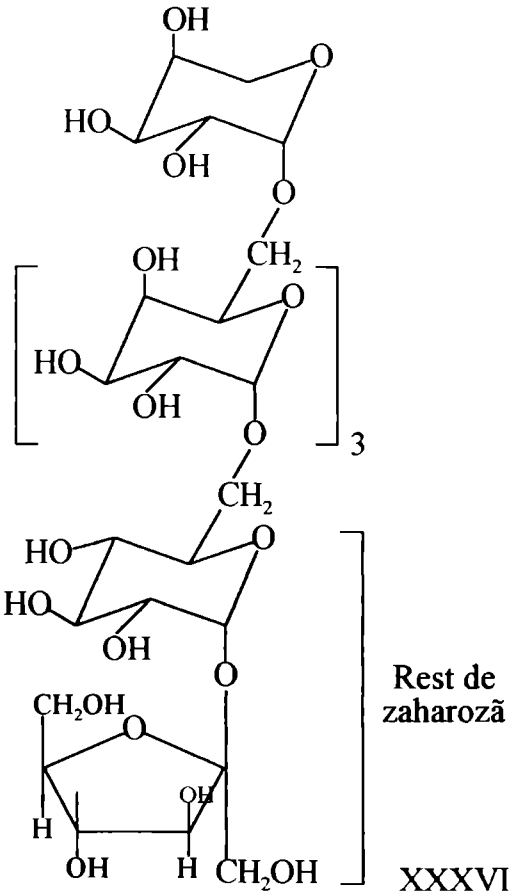
Ajugona este nereducătoare, şi are proprietăți fizice şi chimice asemănătoare cu cele ale stahiozei.

Cantități mici de ajugonă s-au identificat în ierburi şi semințe de Vicia sativa, rădăcini de Ajuga nipponensis, de Salvia pratensis, de Verbascum thapsiforme etc.

În organismele animale, oligoglucidele sunt părți componente ale glicoproteinelor cu diverse destinații: secreție, încorporare în membrane, localizare în interiorul membranelor organitelor celulare.

Legarea oligoglucidului pe proteine are loc într-o etapă distinctă, după sinteză ribozomială a lanțurilor polipeptidice (vezi capitolul IV).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



XXXVI

I.3. Poliglucide

Poliglucidele (polizaharide, glicani) sunt formate din peste 6 resturi de monoglucide legate prin legături glicozidice.

Această clasă de compuşi este extrem de răspândită în natură, în regnurile vii.

După natura resturilor de monoglucide care îi compun, glicanii se clasifică în:

-homopoliglucide (formate dintr-un singur tip de monoglucide) şi

-heteropoliglucide (formate din diferite monoglucide).

La rândul lor, homopoliglucidele pot fi clasificate după natura monoglucidelor constituente (glucozani, fructozani, xilani, manani, galactani etc.) sau după numărul de atomi de carbon din moleculele acestora ca: pentozani (arabanii, xilanii), hexozani (glucozanii, fructozanii, mananii, galactanii) etc.

Spre deosebire de proteine sau de acizii nucleici, poliglucidele prezintă mai curând lanţuri liniare decât ramificate, din cauză că legăturile glicozidice se pot forma cu orice grupă hidroxi a resturilor de monoglucide.

În cele ce urmează, vom trece în revistă poliglucidele cele mai răspândite, în corelaţie cu funcţia şi importanţa lor biochimică.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În ceea ce privește denumirile proprii ale poliglucidelor, ele s-au stabilit în funcție de proveniența acestora. Astfel, celuloza este constituentul principal al pereților celulari ai plantelor; dermatanul se găsește în dermă, heparina s-a izolat din ficat etc.

Poliglucidele au două funcții principale în organismele vii: de rezervă (amidon, inulină, glicogen) sau structurale (celuloză, chitină, materii pectice, heparină, condroitină etc.).

I.3.1. Poliglucide de rezervă

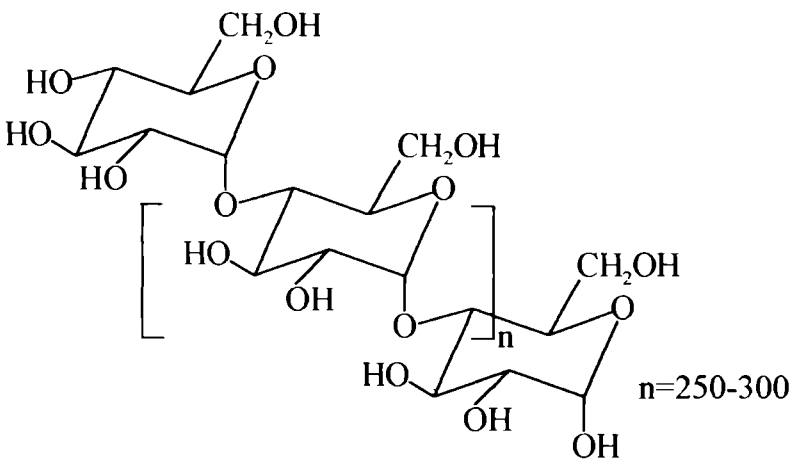
Aceste poliglucide se formează prin metabolizarea în celule vegetale şi animale a excesului de monoglucide (peste cantitățile necesare organismelor). Ele sunt stocate în citoplasma celulară; în caz de nevoie, organismele utilizează poliglucidele de rezervă, care sunt hidrolizate enzimatic până la glucoză (în cazul amidonului şi glicogenului).

I.3.1.1. Amidonul este un amestec de două specii poliglucidice (amiloza şi amilopectina), constituind polizaharidul de rezervă din plante.

•Amiloza are o structură liniară, formată din resturi de D-glucopiranoză legate α-1,4-glicozidic.

Deşi amiloza (XXXVII) este izomeră cu celuloza, aceste două poliglucide au proprietăți total diferite. Aceasta, deoarece legăturile β-1,4-glicozidice din molecula celulozei determină o inversare cu 180° a fiecărui rest de D-glucoză față de cele vecine, ceea ce face ca polimerul să adopte o conformație "împachetată", sub formă de fibră. Fibrele de celuloză sunt formate din aprox. 40 lanțuri glucanice paralele.

În contrast, α-amiloza, cu legături α-1,4-glicozidice, adoptă o conformație elicoidală neregulată.

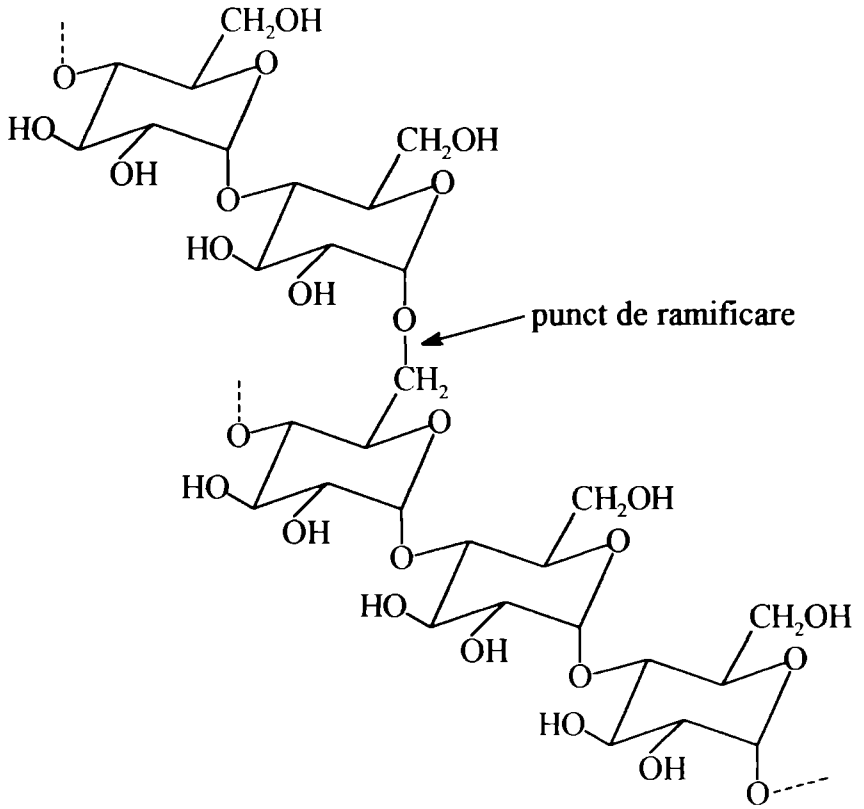


XXXVII

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

•Amilopectina (XXXVIII) are o structură tridimensională, formată din lanțuri liniare de D-glucopiranoză legate α-1,4-glicozidic; la fiecare 24-30 resturi de glucoză, lanțurile liniare sunt reticulate între ele prin legături α-1,6-glicozidice. În punctele de ramificare, D-glucoza pune în joc grupele hidroxil din pozițiile 1 şi 6.

Moleculele de amilopectină au o masă moleculară în jur de 10^6, fiind printre cele mai mari existente în natură.



XXXVIII

Amiloza şi amilopectina pot fi scindate sub acțiunea a două hidrolaze: α- şi β-amilaza.

Fiind o endohidrolază, α-amilaza (din salivă, suc pancreatic, malț, bacterii, Aspergillus etc.) atacă legăturile α-1,4-glicozidice din orice punct din interiorul catenelor liniare, ocolind punctele de ramificație ale amilopectinei. Ca rezultat al reacției, se formează un amestec de: D-glucoză, maltoză şi α-dextrine. În prezența enzimei R (din cartofi) se scindează şi α-dextrinele, solubilizându-se.

β-Amilaza (din soia, malț, cartof dulce etc.) hidrolizează amiloza începând de la capătul nereducător al catenei, ca produs de reacție formându-se maltoza.

În urma acestei reacții, numai 70% din amiloză este hidrolizată. Pentru o hidroliză completă este necesară prezența enzimei Z, cu specificitate pentru legăturile β-glicozidice. De aici, s-a tras concluzia ca amiloza nu are o structură complet liniară; din loc în loc, pe catenele principale ale polimerului sunt ataşate molecule de D-glucopiranoză prin legături β-glicozidice cu grupele hidroxil din poziția 3 a unui rest de glucoză din lanțul principal.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În ceea ce priveşte amilopectina, β-amilaza desprinde molecule de maltoză de pe lanţurile liniare, începând de la capătul nereducător al acestora şi ocolnd punctele de ramificare. Rezultă un amestec de maltoză şi β-dextrine insolubile.

În general, hidroliza enzimatică a amidonului cu α- şi β-amilaza conduce la 60-70% maltoză, restul de 30-40% fiind produşi insolubili ("dextrine limită").

Scindarea hidrolitică ulterioară a maltozei la D-glucoză are loc sub influenţa glucoamilazei.

Hidroliza enzimatică a amidonului a devenit un procedeu industrial de rutină pentru obţinerea glucozei alimentare, a etanolului şi a berii din amidon de porumb sau de cartofi.

Digestia amidonului, ca sursă esenţială de glucide pentru organismul uman, începe din cavitatea bucală. Saliva, care conţine α-amilază, hidrolizează toate legăturile α-1,4-glicozidice ale amidonului, cu excepţia celor implicate în punctele de ramificare.

În trecerea prin stomac, a cărui aciditate inactivează α-amilaza, fragmentele scindării parţiale a amidonului sunt hidrolizate până la D-glucoză. Digestia continuă în intestinul subţire, în prezenţa α-amilazei pancreatice, a cărei actiune este similară celei a enzimei salivare.

Această enzimă degradează amidonul la un amestec de maltoză, un triglucid (maltotrioza cu trei resturi de D-glucoză legate α-1,4-glicozidic) şi dextrine (oligoglucide care conţin ramificaţii α-1,6-glicozidice).

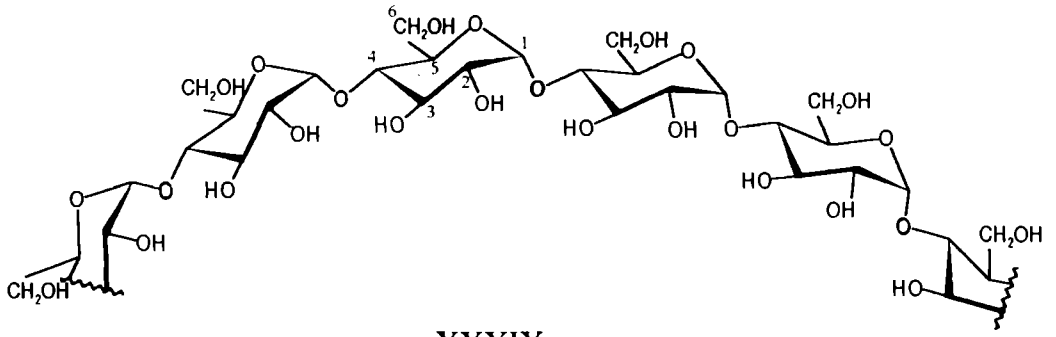
Aceste oligoglucide sunt hidrolizate la glucoză de enzimele specifice secretate de membrana mucoasei intestinale: o α-glucozidază, o α-dextrinază (enzimă de deramificare), o sucrază şi, la copii, o lactază. Moleculele de monozaharid rezultate sunt absorbite de mucoasa intestinală şi transportate în circulaţia sângelui.

Foarte interesantă este şi acţiunea ciclodextrinazei din Bacillus macerans asupra amidonului. Această enzimă are proprietatea de a segmenta lanţurile poliglucidice ale amidonului în oligoglucide, pe care la ciclizează. Se obţin dextrine ciclice sau dextrine Schardinger.

Ciclizarea are loc prin formarea de legături α-1,4-glicozidice dintre grupa OH de la capătul reducător şi cea din poziţia 4 a capătului nereducător al lanţului (XXXIX). Neavând deci un capăt nereducător, ciclodextrinele nu sunt scindate hidrolitic de β-amilază.

Pentru ca β-amilaza să poată scinda ciclodextrinele, este necesară prezenţa ciclodextrinazei; se poate trage concluzia că acţiunea ciclodextrinazei este reversibilă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



XXXIX

Fig.I.3 – Structura ciclodextrinei

Ciclodextrinele au fost clasificate în funcție de numărul de resturi de D-glucoză din lanțul ciclic în: α-ciclodextrine (6 resturi), β-ciclodextrine (7 resturi), γ-ciclodextrine (8 resturi) etc.

Corey, Pauling și Koltun au determinat conformația spațială a ciclodextrinelor, arătând că aceasta are forma unui tor. Interiorul torului are trei contururi circulare: unul care traversează (imaginar) atomii C_1 din resturile de glucoză, altul care conține atomii de oxigen glucozidici și încă unul care trece prin atomii C_4. Această conformație are ca rezultat formarea unei cavități în molecula ciclodextrinelor, ceea ce le conferă unele proprietăți specifice (formare de compuși de incluziune, efecte catalitice etc.).

I.3.1.2. Glicogenul ("Amidonul animal")

Glicogenul, poliglucidul de rezervă al animalelor, este prezent în toate celulele animale, dar mai ales în mușchiul scheletului și în ficat, sub formă de granule citoplasmatice. De exemplu, conținutul în glicogen al ficatului poate ajunge la peste 10% din greutatea sa totală.

Structura primară a glicogenului se aseamănă cu cea a amilopectinei, cu deosebirea că ramificațiile sunt mai numeroase dar mai scurte, cu puncte de ramificare la fiecare 8-12 resturi de D-glucoză.

Având un grad de polimerizare mult mai mic decât cel al amilopectinei, glicogenul este solubil în apă (fig.I.4).

Biosinteza glicogenului are loc în ficat; D-glucoza exogenă (provenită din glucidele ingerate și prelucrate în tubul digestiv) este absorbită prin mucoasa intestinală și transportată prin circulația sângelui la ficat.

O parte din glucoză este distribuită pe cale circulatorie în toate celulele organismului (unde servește ca substrat material și sursă de energie), iar surplusul este transformat în glicogen și depozitat în ficat.

Degradarea glicogenului în celulă, pentru uz metabolic, are loc sub influența glicogen-fosforilazei care catalizează scindarea fosforilantă a legăturilor α-1,4-glicozidice, începând de la capetele nereducătoare; se formează glucozo-1-fosfat (esterul lui Cori).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Structura înalt ramificată a glicogenului, cu multe capete nereducătoare, permite mobilizarea rapidă a glucozei în timpul acestui proces metabolic, cunoscut sub denumirea de glicogenoliză. Legăturile α-1,6-glicozidice din molecula glicogenului se rup sub influența unei enzime de deramificare, care joacă un rol important în metabolismul glucozei. Nivelul glicemiei în organism este reglat prin glicogenoliză, când din glicogenul de rezervă sunt hidrolizate cantitățile necesare, iar glucoza rezultată este repusă în circulație.

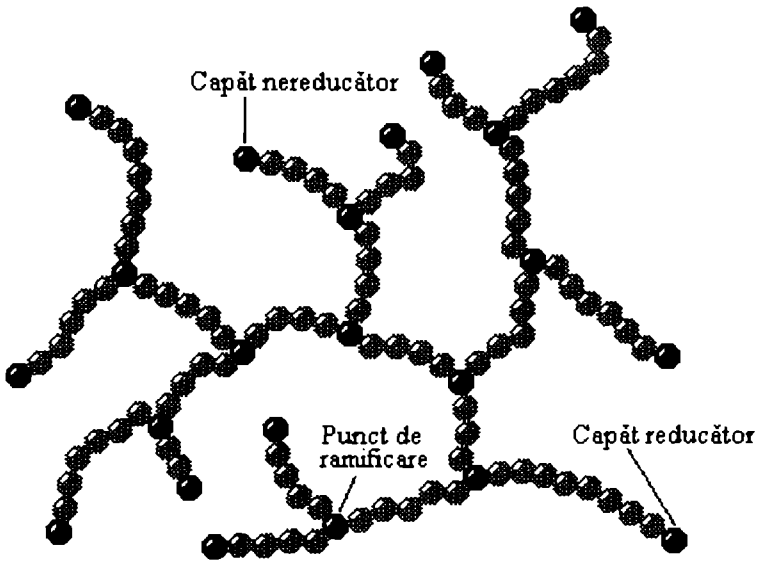


Fig. I.4 – Conformația spațială a glicogenului

I.3.1.3. Inulina (XL) este un fructozan de rezervă, de origine vegetală, răspândit în familiile compositae şi liliaceae, mai ales toamna. Cantități mai mari de inulină se găsesc în rădăcinile de cicoare, de nap porcesc, dalie, iarbă mare etc.

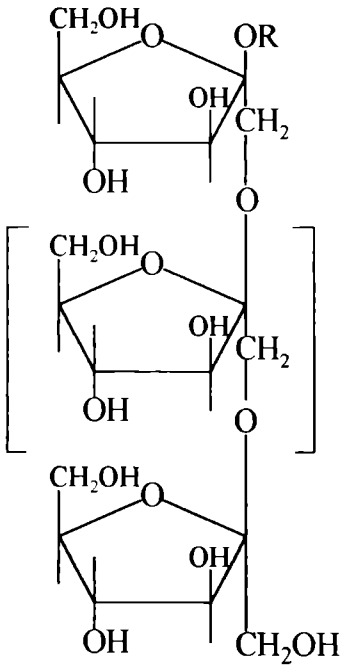
Studii de determinare a structurii au arătat că inulina este formată din 30 resturi de D-fructofuranoză, legate prin legături β-2,1-glicozidice.

Gradul relativ mic de policondensare explică solubilitatea inulinei în apă, iar faptul că este nereducătoare a fost pus pe seama blocării grupei OH glicozidice de la capătul reducător printr-o legătură 2,1-diglicozidică cu un rest de α-D-glucoză (XL), R=1-α-D-glucopiranozil).

Inulina este o substanță solidă, albă, greu solubilă în apă rece şi solubilă în apă la fierbere.

Inulina este levogiră ($[\alpha]_D^{20} = -40,2^o$) şi se hidrolizează uşor, fie cu enzima inulaza, fie prin fierbere îndelungată în apă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



XL

Acest fructozan este utilizat în determinări clinice, pentru că nu poate pătrunde în celulă; inulina este injectată intravenos pentru determinarea spațiului extracelular şi a vitezei de filtrare glomerulare.

Există şi fructozani cu mase moleculare mai mici şi cu o toleranță biologică mai bună.

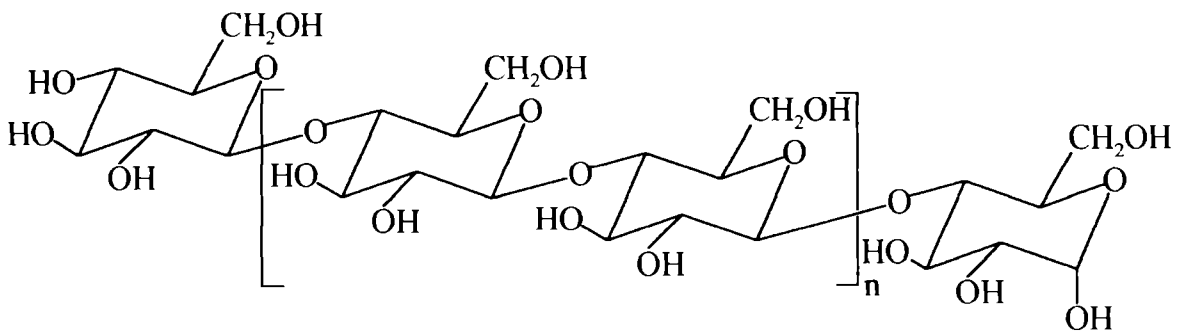
I.3.2. Poliglucide structurale

Aceste polglucide, indispensabile organismelor vii, sunt distribuite în pereții celulelor, în spațiul intracelular, în țesuturile de legătură, în pereții vaselor sanguine etc.

Poliglucidele structurale imprimă țesuturilor animale şi vegetale forma, elasticitatea şi rigiditatea caracteristice, jucând în principal un rol de susținere.

I.3.2.1. Poliglucide structurale din regnul vegetal

A.Celuloza este un polimer liniar (glucan) conținând până la 15.000 resturi de D-glucoză, legate 1,4-β-glicozidic (XLI).



XLI

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

După cum se observă, unitatea structurală a celulozei este celobioza; în funcție de specie, masele moleculare ale diverselor varietăți de celuloză sunt cuprinse între limitele 50-2500 KDa.

Celuloza este materialul de susținere a peretelui celulelor vegetale; lemnul, fibrele de in și bumbacul conțin cantitățile cele mai mari de celuloză; dintre acestea, bumbacul și inul conțin celuloza cea mai pură.

Celuloza din lemn nu este o substanță unitară, fiind un amestec de trei varietăți: α, β și γ-celuloza. α-Celuloza este un poliglucid cu gradul de polimerizare n>100, insolubil în NaOH 17,5%; β-Celuloza, solubilă, are n=10-100, iar γ-celuloza, de asemenea, solubilă în NaOH 17,5% este de fapt un amestec de oligoglucide cu n<10.

Calitatea celulozei este cu atât mai bună cu cât conținutul în varietatea α este mai ridicat.

Celuloza se mai găseşte şi în spațiul extracelular al unor nevertebrate inferioare şi se poate forma în mediile de cultură conținând hexoze ale unor bacterii (Acetobacter xilinium).

Difracția cu raze X a arătat că, deşi este amorfă ca aspect, celuloza prezintă proprietăți de substanță cristalină. Spre deosebire de cristalele moleculelor mici (în care celula elementară conține una sau mai multe molecule), macromolecula celulozei se întinde pe mai multe celule cristaline elementare. Macromoleculele nu sunt aranjate paralel decât în anumite regiuni (cristalite, microfibrile), în afara cărora au o aşezare amorfă, neregulată.

În plante, moleculele de celuloză sunt asociate sub formă de fibrile dispuse paralel şi reticulate prin legături de hidrogen, formând matricea peretului celular. Pachetele dense de fibrile din pereții celulari ai plantelor sunt cimentate prin alte trei materiale polimere: hemiceluloza, pectina şi extensina. Hemicelulozele predomină; ele sunt formate din D-xilani (polimeri ai D-xilozei, cu legături 1,4-β-glicozidice şi cu resturi laterale de arabinoză şi alte glucide).

Pectina este un polimer al metil-D-galacturonatului, iar extensina, o proteină, este ataşată covalent de fibrilele celulozice.

Extensina se aseamănă cu colagenul din celulele animale prin conținutul ridicat în resturi de hidroxiprolină. Acest aranjament al macromoleculelor de celuloză conferă pereților celulelor vegetale o rezistență şi rigiditate crescute.

Lemnul conține şi o altă substanță polimeră, lignina, care reprezintă aproape 25% din greutatea sa; structural, lignina este formată din alcooli alchil-aromatici polimerizați.

Hemiceluloza, pectina, extensina, lignina, alături de coloranți, săruri minerale şi lipidele specifice sunt materiale străine conținute în pachetele de fibrile celulozice şi denumite "incruste".

Degradarea biochimică a celulozei are loc în sol, sub influența unor procese enzimatice complexe, produse de microorganisme în condiții aerobe şi anaerobe. În condiții aerobe, rezultatul final este formarea de dioxid de carbon şi apă, iar degradarea anaerobă cnduce la acizi graşi, dioxid de carbon, metan şi hidrogen.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Catena poliglucidică a celulozei se poate scinda până la D-glucoză în două etape: complexul enzimatic denumit celulază hidrolizează celuloza la celobioză, iar aceasta este scindată hidrolitic la D-glucoză, sub influența celobiazei.

Celulaza şi celobiaza sunt prezente şi în tubul digestiv al rumegătoarelor, pentru care celuloza este un aliment indispensabil. În schimb, pentru oameni şi unele animale, celuloza nu are importanță alimentară, aceste organisme nefiind echipate cu enzimele necesare zaharificării poliglucidei.

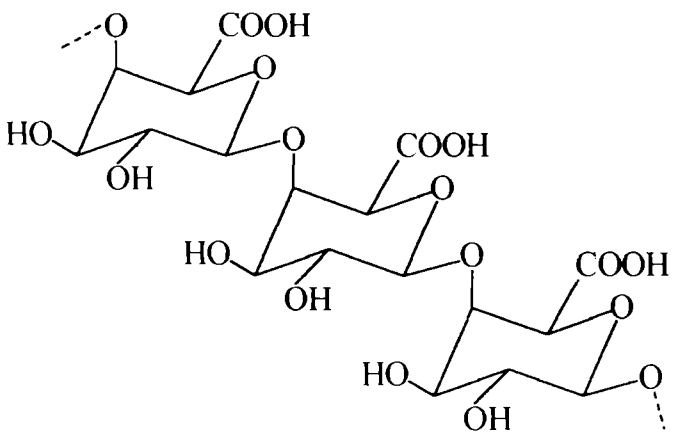
Hemicelulozele, prezente în lemn (în proporție de 17-43% din masa uscată), semințe, paie, coji etc. sunt solubile în soluții diluate de hidroxid de sodiu în care se extrag, separându-se astfel de celuloză. Hemicelulozele conțin pentozani, hexozani, acizi poliuronici şi gume vegetale. Din pentozanii separați astfel se fabrică xiloza şi furfurolul, iar hexozanii folosesc la fabricarea etanolului, la cultivarea drojdiilor furajere etc.

Materiile pectice sunt amestecuri heterogene de poliglucide, având în compoziție acizi pectici, arabani şi galactani. Aceste materii pectice sunt substanțe solide, amorfe, de culoare albă sau gălbuie, care se pot îmbiba în contact cu apa. Soluțiile lor apoase concentrate au aspect de geluri transparente. Compoziția lor chimică variază de la o sursă naturală la alta, fără deosebiri majore.

Materiile pectice se compun dintr-o parte insolubilă în apă (pectoze) şi alta solubilă în apă la cald (pectine).

Pectozele sunt asociații dintre pectine şi celuloză formate în țesuturile vegetale tinere, reprezentând un stadiu preliminar al pectinelor. Pe măsură ce organismul se maturizează, această asociere este scindată enzimatic, cu formare de pectină şi celuloză.

Acidul pectic (XLII) este un poliuronid simplu, format din resturi de acid D-galacturonic, în care grupele –COOH sunt esterificate parțial cu metanol şi neutralizate parțial cu ioni Ca^{2+} şi Mg^{2+}. Resturile de acid D-galacturonic sunt legate 1,4-β-glicozidic.



XLII

Masa moleculară a acidului pectic, dependentă de sursa naturală, variază între limitele 25-100 KDa.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Pectinele, prezente în cantități mai mari în sâmburii de mere, pere, gutui, zmeură şi fragi etc., se utilizează la fabricarea gemurilor şi jeleurilor. Acest lucru se datorează uşurinței cu care pectinele formează geluri stabile la încălzirea cu soluții apoase de zaharoză slab acidulate.

Pentru că formează soluții vâscoase, pectinele se mai folosesc şi la prepararea cleiurilor.

Un inconvenient legat de prezența materiilor pectice în sucurile de fructe, rachiul de orez, vinuri sau bere, este tendința de a precipita în timp, scăzând valoarea comercială a acestor produse. Pentru limpezirea lor se folosesc sisteme enzimatice capabile de a solubiliza materiile pectice, prin scindarea hidrolitică a moleculelor de acid pectic.

B.Gume vegetale

Aceste substanțe cleioase apar sub formă de exudate în coaja pomilor sau în fructe, pe locuri lezate mecanic sau sub acțiunea unor microorganisme. Se mai găsesc în semințe de in, cânepă, secară etc. Ca structură chimică, gumele vegetale sunt heteropoliglucide cu mase moleculare de 200-300 KDa şi cu structură ramificată şi neunitară in funcție de sursa de proveniență.

Catenele poliglucidice principale sunt formate din resturi de D-galactopiranoză legate 1,3- şi 1,6-glicozidic. Ramificațiile catenelor conțin resturi de acizi aldobiuronici derivați de la acidul D-glucuronic şi D-galactoză sau D-manoză, alături de resturi de L-arabinoză, L-ramnoză şi D-xiloză, toate sub formă piranozică.

Diversele varietăți de gume pot avea caracter acid imprimat de prezența grupelor –COOH ale acizilor uronici, ca guma arabică produsă de specii de Accacia tropicalis, sau de prezența grupelor sulfat (gumele din alge).

Alte gume pot avea caracter neutru, datorită lipsei grupelor acide. Este cazul galactanilor şi galactomananilor din tuberculii unor plante sau din semințele plantelor leguminoase.

Gumele vegetale se utilizează la obținerea unor produse comerciale ca: guma arabică, guma de Cordofan, guma de Gedda, guma de Gezireh, guma de Senegal etc.

Datorită proprietăților sale de a forma soluții apoase cleioase şi vâscoase, guma arabică se foloseşte ca adeziv (clei) pentru legătorii, ca apret în industria textilă sau la fabricarea cernelurilor şi vopselelor pentru pictură.

C.Mucilagii vegetale

Aceste substanțe sunt heteropoliglucide de proveniență intra- sau intercelulară, prezente în majoritatea organismelor vegetale. În calitate de constituenți ai învelişului organelor plantelor (coajă, semințe etc.), mucilagiile împiedică procesul de deshidratare a plantelor.

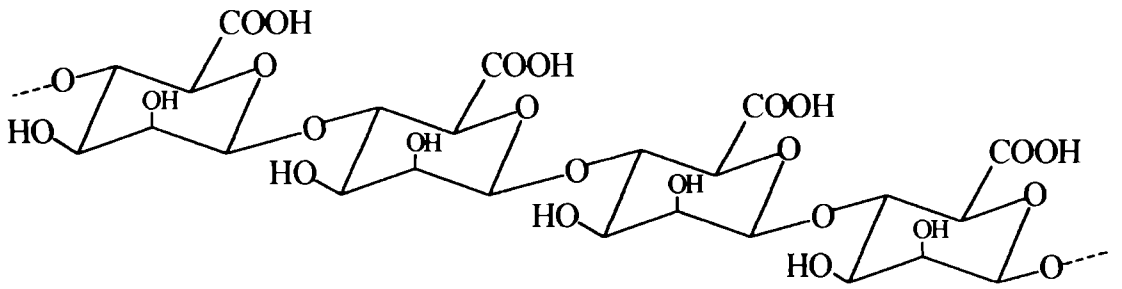
Structural, mucilagiile vegetale sunt înrudite cu gumele vegetale şi de aceea separarea lor este foarte laborioasă şi uneori imposibilă.

Ca şi în cazul gumelor, structura mucilagiilor vegetale depinde de specia de la care provin.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Majoritatea mucilagiilor conduc însă prin hidroliză la un amestec de monoglucide: L-ramnoză, L-arabinoză, D-glucoză, D-fructoză, D-galactoză, ca şi la acizi uronici sau metoxiuronici. Unele mucilagii nu conţin acizi uronici.

D.Acidul alginic a fost izolat din specia de alge brune Phaeophyceae. Acest compus este constituentul poliglucidic major al algelor, fiind un copolimer al acizilor D-manuronic şi D-guluronic, legaţi 1,4-β-glicozidic. În catena principală predomină acidul D-manuronic (XLIII).



XLIII

Acidul alginic este solid, incolor şi insolubil în apă, dar solubil în soluţii de hidroxizi şi carbonaţi alcalini, cu care formează geluri asemănătoare cu cele ale acidului pectic.

În natură, acidul se găseşte în special sub formă de sare de sodiu (alginat), solubilă în apă. Sărurile sale cu ionii: Ca^{2+}, Ba^{2+}, Sr^{2+} sunt insolubile şi se utilizează la imobilizarea enzimelor sau a celulelor pentru bioreactoare din industria alimentară (de exemplu, pentru imobilizarea drojdiei de bere folosită la obţinerea etanolului de fermentaţie).

Fiind slab alcalini, alginaţii solubili se utilizează in industria farmaceutică, pentru fabricarea pansamentelor gastrice. Acidul alginic se foloseşte ca apret de calitate superioară în industra textilă, ca stabilizator pentru băuturile răcoritoare, creme şi îngheţate (în industria alimentară), pentru prepararea filmelor şi emulsiilor fotografice, pentru prepararea cimenturilor dentare, în industria celulozei şi hârtiei etc.

E.Kapa (k) carageenan

k-Carageenanul este o heteropoliglucidă, extrasă din alge marine (Eucheuma cottonii), formată în principal din 4-sulfatul β-D-galactozei şi din 3,6-anhidro-D-galactoză. Cu excepţia sării sale de sodiu, k-carageenanul este insolubil în apă rece, cu care formează o dispersie grosieră; la încălzire are loc dizolvarea completă.

Temperatura de gelificare şi calitatea gelului format depind atât de concentraţia poliglucidului din soluţie cât şi de cationii prezenţi (K^+, NH_4 , Ca^{2+}). Astfel, dacă se înlocuiesc ionii de K^+ prezenţi în polimerul natural cu ionii Na^+, temperatura de gelificare scade considerabil. k-Carageenanul prezintă fenomenul de histeresis, temperatura sa de gelificare fiind inferioară temperaturii de topire.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

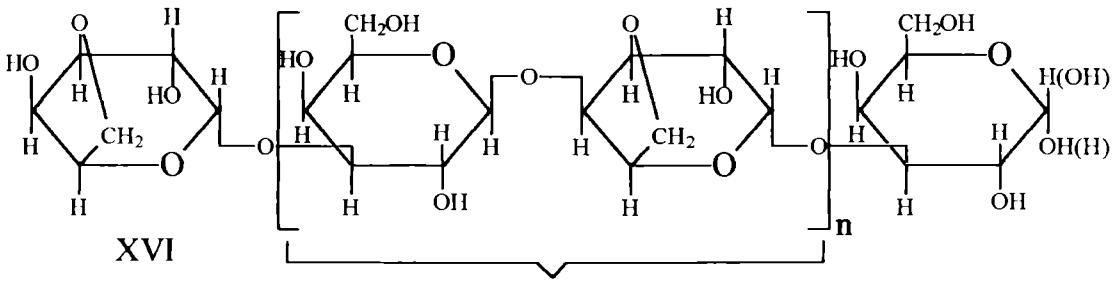
Neavând efecte toxice, k-carageenanul se utilizaează la condiționarea unor produse alimentare.

F.Agarul este un heteropoliglucid izolat din unele specii de alge maritime (Gelidium amansii). În principal, poliglucidul conține lanțuri liniare în care resturile de D-galactoză alternează cu cele de 3,6-anhidro-L-galactoză. Din loc în loc, lanțurile reticulate sunt întrerupte de microcristalite.

S-a demonstrat că agarul conține de fapt două componente: agaropectina (încărcată electric) şi agaroza (neutră din punct de vedere electric). Datorită prezenței sarcinilor electrice care pot determina reacții secundare nedorite, agarul este puțin utilizat în operații ca: separări cromatografice, imobilizări de enzime etc.

Mult mai utilizată este agaroza (XLIV), care se obține prin extracția acidă a agarului, sau prin precipitarea fracționată a acestuia cu polietilenglicol.

Unitatea structurală a agarului este agarobioza.



XVI

Agarobioza

XLIV

Gelurile apoase de agaroză poartă denumirea comercială de Sepharoză. Ele sunt foarte stabile, nu-şi modifică volumul în contact cu apa şi prezintă (ca şi k-carageenanul) o temperatură de gelificare inferioară temperaturii de topire a gelului.

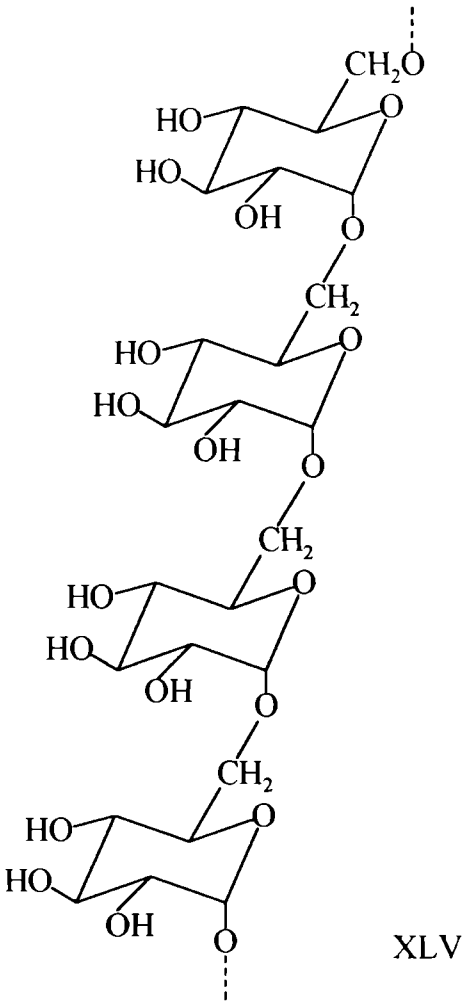
Din aceste motive, varietățile comerciale de Sepharoză sunt utilizate atât ca adsorbant în cromatografie cât şi pentru imobilizarea unor enzime sau culturi de celule folosite în industriile alimentară şi farmaceutică, pentru biosinteza unor produşi alimentari de fermentație, ca şi pentru obținerea pe cale biosintetică a unor medicamente.

G.Alte poliglucide de natură vegetală

1°Dextranul (XLV) este un glucan care se formează ca produs secundar în procesul de extracție a zaharozei din sfeclă, dacă instalațiile sunt infestate microbiologic cu Leuconostoc mezenteroides, tulpina NRRLB-512.

Dextranul are o consistență gelatinoasă şi împiedică cristalizarea zahărului; poliglucidul este format din resturi de D-glucoză legate 1,6-α-glicozidic (XLV).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

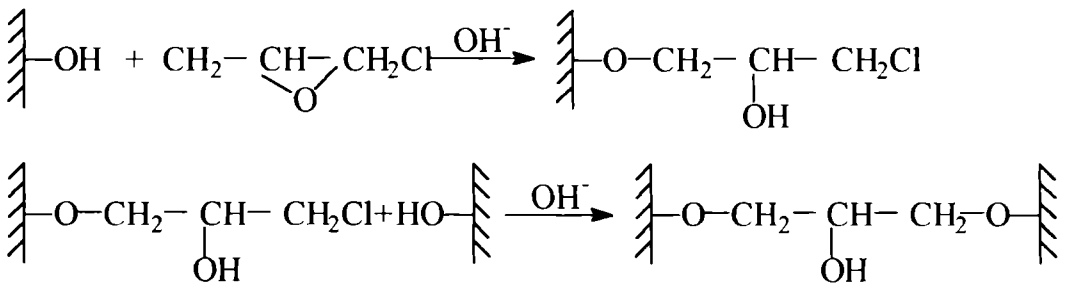


XLV

Legăturile α-1,6-glucozidice reprezintă 90-95%; restul de 10-5% sunt legături de tip 1,3-α-glucozidic. Masa moleculară a dextranului poate ajunge până la 1000 KDa.

Varietățile comerciale de gel apos de dextran reticulat se numesc Sephadex. În funcție de gradul de reticulare, ca şi de dimensiunile particulelelor de gel, Sephadexul este utilizat ca material adsorbant pentru cromatografia în strat subțire şi pe coloană şi pentru imobilizarea unor biocatalizatori (enzime, celule, organite celulare etc.).

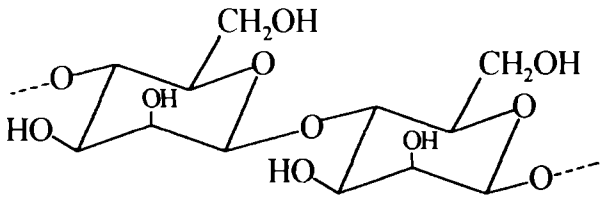
Reticularea dextranului (ca şi a agarozei) se realizează cu epiclorhidrină, reactiv difuncțional capabil de a lega simultan lanțurile liniare ale poliglucidului, transformându-le în macromolecule tridimensionale, insolubile în apă şi cu o rezistență crescută la variațiile de temperatură şi presiune, la agenții chimici şi la atacul microbian:



https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Dextranul se mai utilizează şi în practica medicală, ca înlocuitor de plasmă sanguină.

2°Mananii din nuca de fildeş, lemnul sâmburilor de curmale şi coacăze, sunt polihomoglucide compuse din resturi de D-manopiranoză legate β-1,4-glicozidic (XLVI).



XLVI

1.3.2.2. Poliglucide structurale de origine animală

Din această clasă de poliglucide fac parte glucozaminoglicanii, componente ale mucopoliglucidelor. Mucopoliglucidele de origine animală sunt formate din două componente: o proteină şi un heteropoliglucid (glucozaminoglican), care este predominant. Cele două componente sunt legate prin legături electrovalente.

Spaţiile extracelulare din jurul ţesuturilor conjuctive din cartilagii, tendoane, piele şi pereţii vaselor sanguine, constituite din colagen şi elastină, sunt "încastrate" într-o "matrice" gelatinoasă (substanţe de încastrare). Această "matrice" este compusă în special din mucopolizaharide cu lanţuri glucozaminoglicanice neramificate, în care resturile de acizi uronici alternează cu resturi de hexozamine.

Mucopoliglucidele intervin în cimentarea ţesuturilor, protecţia mecanică a mucoaselor aparatului digestiv, protecţia organismului împotriva microbilor şi a unor toxine bacteriene şi joacă rol de lubrifianţi, înlesnind mobilitatea oaselor şi protejându-le de şocurile mecanice etc.

Heparina este anticoagulant al sângelui, iar chitina formează carapacele rezistente (exoscheletul) ale insectelor, moluştelor, crustaceelor.

După natura componentelor glucidice, mucopoliglucidele se clasifică în:

-mucopoliglucide acide (cele mai răspândite), care conţin resturi de acizi uronci (cu grupe –COOH) şi (sau) grupe sulfonice (SO_3H);

-mucopoliglucide neutre.

1.3.2.2.1.Mucopoliglucide acide

În componenţa acestor poliglucide intră unităţi diglucidice formate din: un acid uronic (acid D-glucuronic sau L-iduronic) şi un derivat hexozaminic (al D-glucozaminei sau al D-galactozaminei), legate în special β-1,3-glicozidic, dar şi β-1,4-glicozidic.

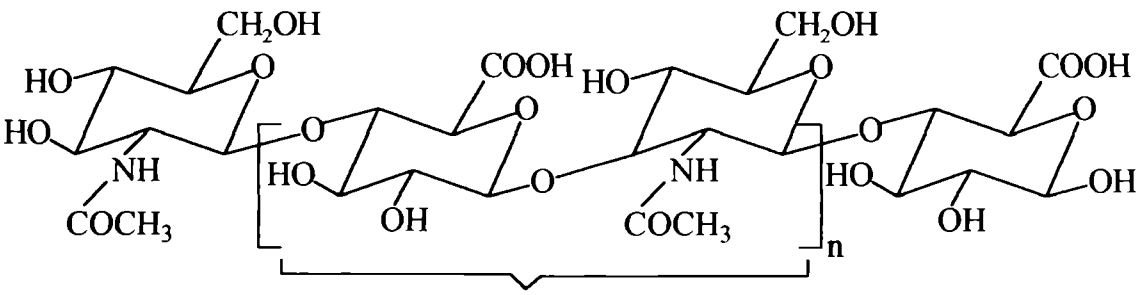
Prezenţa unor grupe acide ionizabile (–COOH sau $–SO_3H$) le imprimă acestor poliglucide caracterul de polielectroliţi anionici, ele participând astfel la fixarea unor cationi în organism.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

A.Acidul hialuronic a fost astfel denumit de la cuvântul *hialis* (gr.) – sticlă – pentru că a fost izolat inițial din umoarea sticloasă a ochiului. Ulterior, a mai fost izolat din: țesuturile conjunctive, cordonul ombilical, dermă, cartilagii, pereții arterelor, lichidul sinovial etc.

În funcție de sursa biologică şi de metoda de izolare, s-au obținut acizi hialuronici cu mase de 200.-9000 KDa.

Moleculele acidului hialuronic sunt compuse din 250-25.000 unități de dizaharid (acid hialobiuronic), constituit din acid D-glucuronic legat β-1,3-glicozidic de un rest de N-acetil-D-glucozamină; aceste unități de dizaharid sunt unite între ele prin legături β-1,4-glicozidice (XLVII).



Acid hialobiuronic

XLVII

Datorită prezenței grupelor –COOH, acidul hialuronic poate lega cationi ca: Na^+, K^+, Ca^{2+}. Astfel, analiza cu raze X a arătat că hialuronatul de calciu este răsucit sub forma unui helix simplu, cu pasul pe stânga, fiecărei spire a elicei corespunzându-i câte trei resturi de unități de acid hialobiuronic.

Structura de tip hialuronat determină funcția biologică a acidului hialuronic. Masa sa moleculară ridicată şi conținutul în grupe anionice ($-COO^-$) fac din hialuronat o moleculă rigidă şi înalt hidratată, care, în soluție, ocupă un volum de aprox. 1000 ori mai mare decât în stare uscată. Soluțiile sale apoase sunt vâscoase şi opun o rezistență ridicată corpurilor scufundate în ele, absorbind şocurile mecanice şi având proprietăți lubrifiante excelente.

La hidroliza acidă (cu H_2SO_4 diluat), acidul hialuronic se depolimerizează, cu scindarea legăturilor β-1,4-glicozidice.

Atât acidul hialuronic cât şi alți glicozaminoglicani sunt hidrolizați degradativ de enzima hialuronidaza, care scindează legăturile β-1,4-glicozidice din macromoleculă.

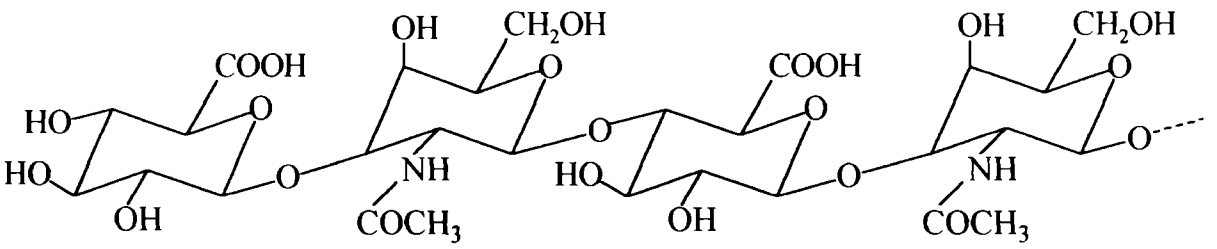
Pe această cale, hialuronidaza din spermatozoizi atacă acidul hialuronic din învelişul ovulului favorizând fecundația. Printr-un mecanism asemănător, hialuronidaza din bacterii permeabilizează țesutul conjuctiv, determinând pătrunderea toxinelor bacteriene în organism. Această acțiune este contracarată de antihialuronidaza din serul sanguin.

B.Glicozaminoglicani cu grupe sulfonice

Aceste poliglucide conțin în moleculă 50-1000 resturi de dizaharid sulfatate.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

1°Condroitina şi condroitin-sulfaţii: Condroitina este înrudită structural cu acidul hialuronic, de care se deosebeşte prin faptul că, în lanţul poliglucidic, alături de resturi de acid D-glucuronic, se găsesc şi resturi de 2-N-acetil-D-galactozamină (XLVIII).



XLVIII

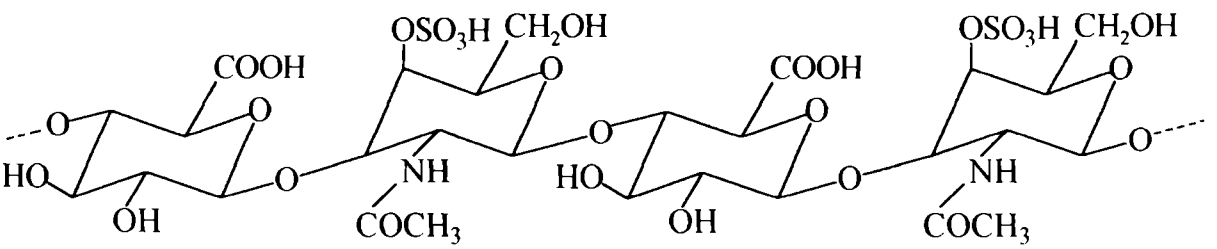
Resturile de acid D-glucuronic şi de 2-N-acetil-D-galactozamină sunt legate între ele alternativ prin legături β-1,3 şi β-1,4-glicozidice.

Cantitativ, condroitina este un component minor al materialului extracelular.

În schimb, esterii condroitinei cu acidul sulfuric (sulfaţii) au o largă răspândire în organismele vertebrate. Cei mai răspândiţi sunt: condroitin-4-sulfatul, condroitin-6-sulfatul, dermatan-sulfatul, keratan-sulfaţii I şi II şi heparina.

2°Condroitin-4-sulfatul (XLIX) sau condroitina A: Denumirea acestei substanţe provine din cuvântul grec *chondros* (cartilagiu). Este componenta majoră a cartilagiilor şi a altor ţesuturi conjunctive (învelişul celular, cornee, oase, ţesuturi de legătură).

Molecula condroitin-4-sulfatului este formată din resturi de acid D-glucuronic şi de N-acetil-D-galactozamino-4-sulfat, legate alternativ prin legături β-1,3 şi β-1,4-glicozidice.

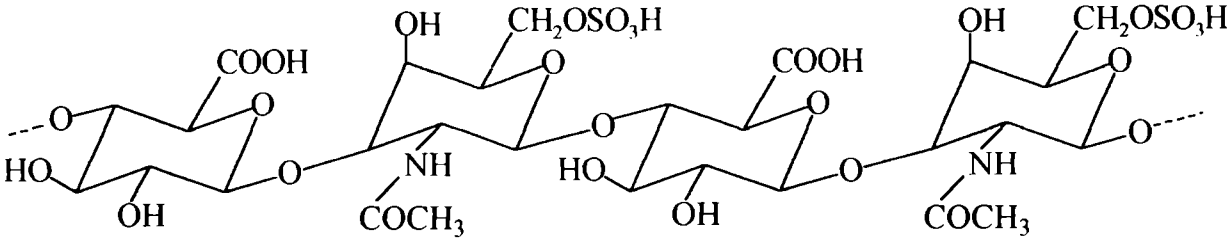


XLIX

3°Condroitin-6-sulfatul sau condroitina C (L) se găseşte separat sau împreună cu condroitin-4-sulfatul în aceleaşi ţesuturi conjunctive, în funcţie de natura acestora.

Poliglucidul este format din resturi de acid D-glucuronic în alternanţă cu resturi de N-acetil-D-galactozamino-6-sulfat, legate prin aceleaşi tipuri de legături ca şi în cazul condroitin-4-sulfatului.

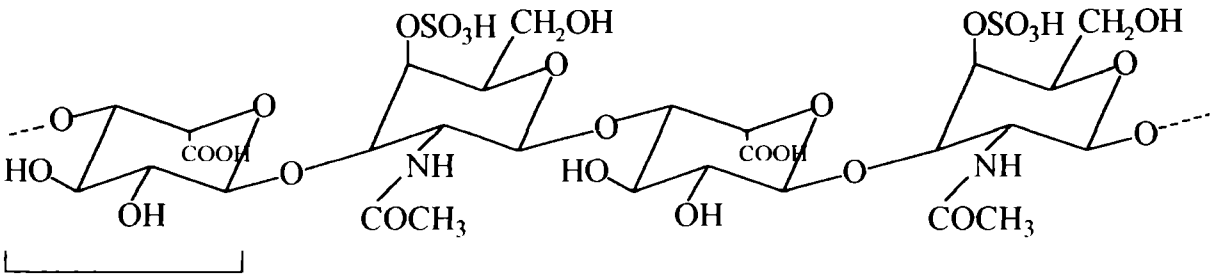
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



L

4°Dermatan-sulfatul (LI) este astfel denumit deoarece predomină în piele. Diferă de condroitin-4-sulfat doar prin inversarea configurației la atomul C_5 din restul de acid β-D-glucuronic, rezultând acidul α-L-iduronic.

Dermatan-sulfatul se formează prin epimerizarea enzimatică a resturilor de acid β-D-glucuronic, după formarea moleculei de condroitină. Epimerizarea este de obicei incompletă, astfel că dermatan-sulfatul rezultat conține şi resturi de acid D-glucuronic neepimerizat, pe lângă cele de acid α-L-iduronic.



Rest de acid
α-L-iduronic

LI

5°Keratan-sulfații I şi II

Keratan-sulfații nu trebuie confundați cu proteina keratină, tratată în capitolul referitor la proteine. Aceste heteropoliglucide se deosebesc de altele prin aceea că nu conțin resturi de acid glucuronic.

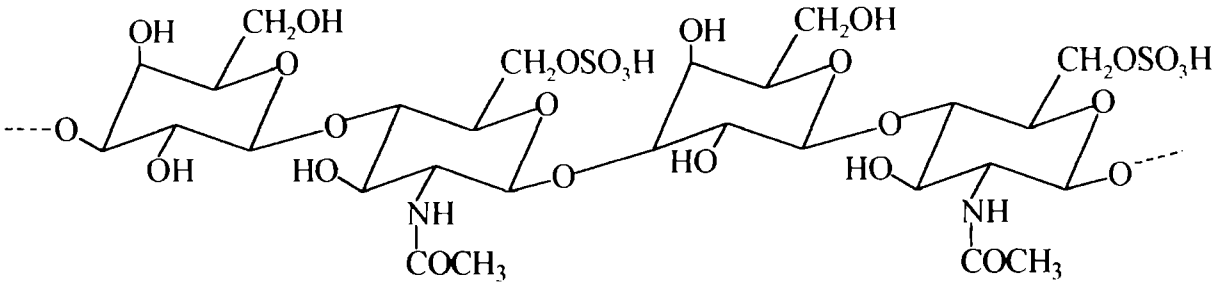
Există două tipuri de keratan-sulfați:

-keratan-sulfatul I (LII) şi

-keratan-sulfatul II (LIIa).

Keratan-sulfatul I este un glicozaminoglican, care conține resturi de D-galactoză alternând cu resturi de N-acetil-D-glucozamino-6-sulfat, legate prin legături β-1,4 şi β-1,3 glicozidice alternante (LII).

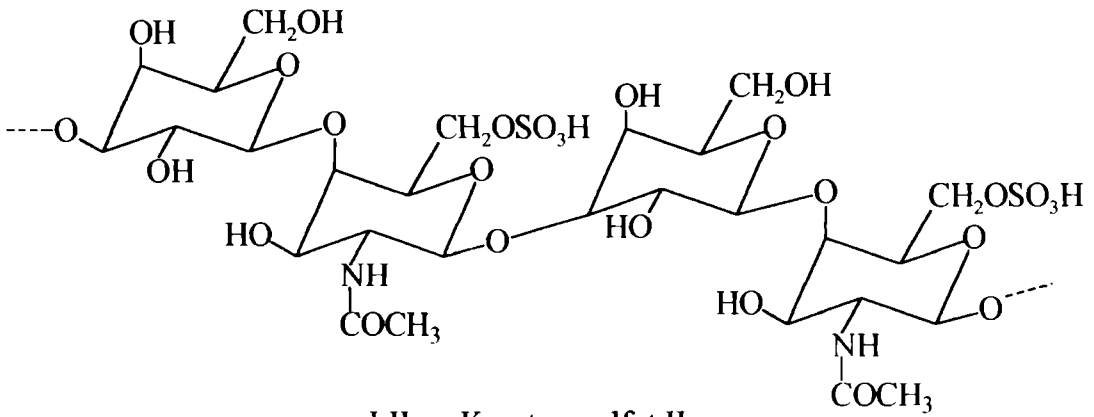
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



LII Keratan-sulfat I

Keratan-sulfatul I se găseşte în cornee.

Keratan-sulfatul II este format din resturi de D-galactoză în alternanță cu resturi de N-acetil-D-galactozamino-6-sulfat, legate alternativ prin legături β-1,4 şi β-1,3 glicozidice (LIIa). Acest poliglucid se găseşte în țesutul scheletic, în cartilaje şi în discurile intervertebrale.



LIIa Keratan-sulfat II

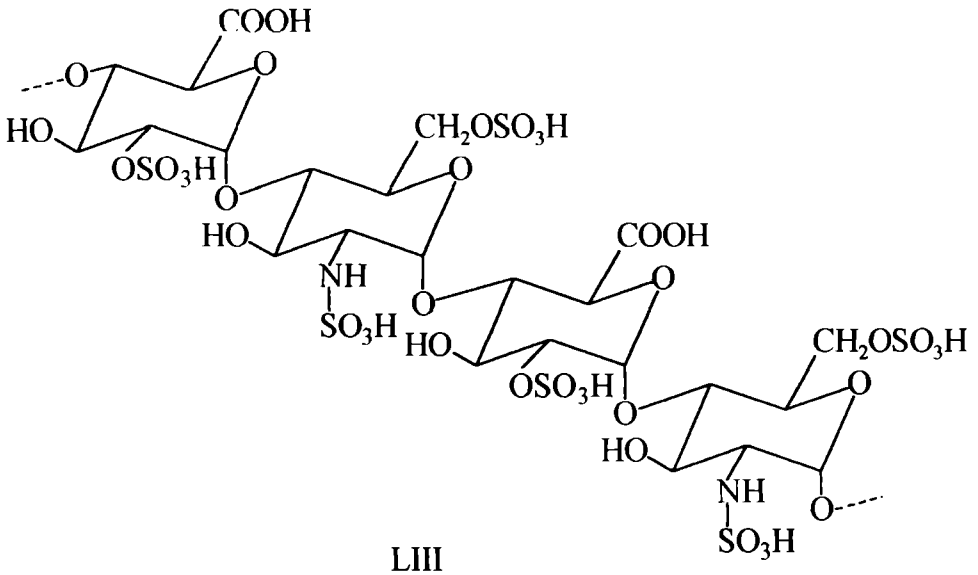
Keratan-sulfații naturali nu au o compoziție omogenă, ei conținând cantități mici de fucoză, manoză, N-acetil-D-glucozamină şi acid sialic, legate în pozițiile terminale ale lanțurilor.

Concentrația de keratan-sulfați din organism creşte odată cu vârsta, ceea ce poate duce la afecțiuni ca: modificări oculare, luxații bilaterale ale cristalinului, dezlipirea corneei, microftalmie, diminuarea drastică a țesutului adipos, curbarea coloanei vertebrale, picior plat, malformații congenitale etc.

6°Heparina (LIII) este un glicozaminoglican cu grad variabil de sulfatare. Molecula heparinei este formată predominant din resturi alternative de acid D-glucurono-2-sulfat şi de 2-N-sulfo-D-glucozamino-6-sulfat, legate α-1,4-glicozidic.

Se pare că în molecula heparinei, 7 din 8 resturi de acid D-glucuronic apar sub formă de sulfat.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



LIII

Heparina este o substanță solidă, incoloră şi solubilă în apă, cu care formează soluții de vâscozitate medie.

În contrast cu ceilalți glicozaminoglicani, heparina nu este un constituent al țesuturilor conjunctive şi se formează aproape exclusiv în granulele intracelulare ale celulelor din pereții arterelor, în ficat, plămâni, splină, timus.

Principala proprietate biologică a heparinei este acțiunea sa anticoagulantă, inhibând coagularea sângelui şi prevenind formarea cheagurilor. Această acțiune, utilizată în clinica medicală se datorează proprietății heparinei de a forma un complex inactiv cu trombokinaza (enzimă care catalizează specific transformarea prototrombinei în trombină). Complexul format dezactivează enzima, împiedicând sinteza trombinei şi deci şi coagularea sângelui.

Sursa naturală cea mai bogată în heparină o reprezintă ficatul şi plămânii de bovine.

1.3.2.2.2.Mucopoliglucide neutre

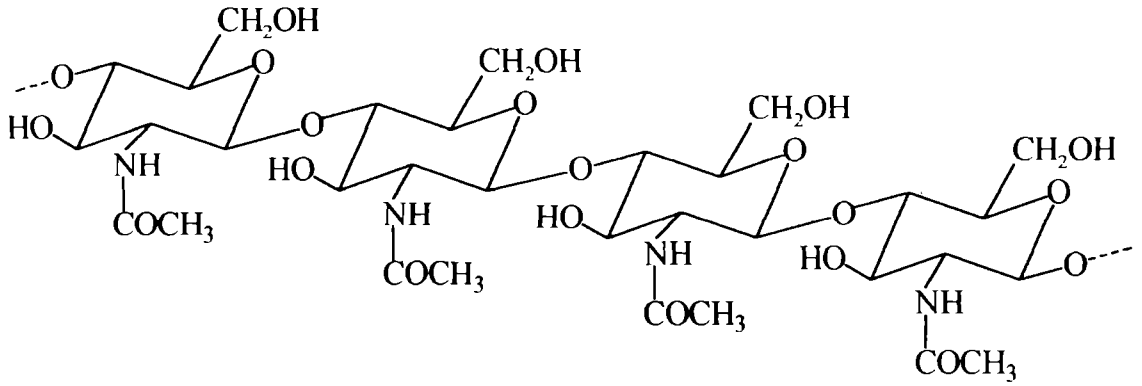
Chitina este mucopoliglucidul structural care formează carapacele insectelor, homarilor, moluştelor, viermilor, racilor, crabilor etc. Cantități mici de chitină se mai găsesc şi în regnul vegetal (în fungi, alge roşii şi verzi etc.).

Chitina este solidă, insolubilă în apă şi solvenți organici. Deşi, structural, se aseamănă cu celuloza (prin prezența legăturilor β-1,4-glicozidice din lanțul poliglucidic, chitina nu se dizolvă în cuproxan (reactivul Schweitzer), care solubilizează celuloza.

Chitina este parțial solubilă în soluții apoase concentrate de săruri de litiu sau calciu şi în acizi minerali concentrați.

Acest poliglucid este format din unități de 2-N-acetil-D-glucozamină legate β-1,4-glicozidic (LIV).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



LIV

Structura chitinei a fost determinată prin hidroliză acidă şi enzimatică.

Astfel, prin hidroliza totală cu HCl suprasaturat, chitina se transformă în acid acetic şi clorhidrat al 2-D-glucozaminei. Sub acțiunea chitinazei (din bacterii şi sucul gastric al melcilor), chitina este scindată hidrolitic până la N-acetil-2-D-glucozamină, cu proprietăți reducătoare.

Chitina este utilizată mai ales ca fază staționară în cromatografia de adsorbție sau pentru imobilizări de enzime, substrate, inhibitori enzimatici etc., în cromatografia afină şi pentru efectuarea de reacții pe suport solid.

Chitina parțial hidrolizată în mediu de HCl conc. conduce la chitosan, un poliglucid cu grad variabil de dezacetilare, în funcție de durata şi temperatura reacției.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

II. AMINOACIZI

Aminoacizii reprezintă o clasă de compuşi organici cu funcţiuni mixte, având formula generală:

$$R - \underset{\underset{NH_2}{|}}{CH} - (CH_2)_n - COOH \qquad (1)$$

În raport de distanţa dintre cele două grupe (NH_2 şi COOH) fixate pe restul hidrocarbonat R, aminoacizii se clasifică în: α-aminoacizi (n=0); β-aminoacizi (n=1); γ-aminoacizi (n=2) etc.

Restul hidrocarbonat poate fi alifatic, aromatic sau heterociclic.

Dintre toţi aceştia, α-aminoacizii prezintă o importanţă deosebită pentru viaţa de pe planeta noastră. Astfel, un număr de 20 α-aminoacizi naturali, denumiţi şi aminoacizi "standard" sunt unităţile constituente ale proteinelor primordiale, conţinute în primele celule vii. Setul acestor biomolecule primordiale este strămoşul proteinelor conţinute în toate organismele vii.

Dintre biomoleculele primordiale, ca rezultat al evoluţiei şi diversificării celulelor, s-au format biomolecule specializate, caracterizate printr-o mare varietate şi complexitate.

Deşi din surse biologice s-au izolat până acum peste 200 de aminoacizi, practic toţi aceştia derivă din cei 20 α-aminoacizi "standard" constituenţi ai proteinelor primordiale.

La rândul lor, dintre aceştia, un număr de 8 α-aminoacizi naturali au fost denumiţi "esenţiali", deoarece organismul uman nu îi poate sintetiza sau îi sintetizează în cantităţi insuficiente; prezenţa lor este însă obligatorie pentru biosinteza proteinelor specifice acestuia. Sursa principală de aminoacizi esenţiali este exogenă (proteinele vegetale şi animale din hrană). Restul de 12 α-aminoacizi naturali "standard" au fost denumiţi "neesenţiali", ei putând fi biosintetizaţi de organism.

II.1. Stereochimie

În afară de glicocol (glicină), toţi α-aminoacizii naturali "standard" conţin un centru de chiralitate, atomul de carbon asimetric din α. Cum, de obicei, dintr-un amestec racemic al unei molecule chirale numai unul dintre enantiomeri prezintă activitate biologică, acest lucru se observă şi în cazul acestor α-aminoacizi.

Cei doi enantiomeri ai unui α-aminoacid (fig.II.1) aparţin din punct de vedere stereochimic familiilor (seriilor) sterice D şi L.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

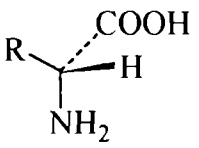
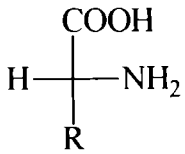
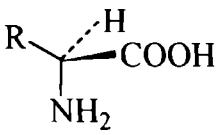
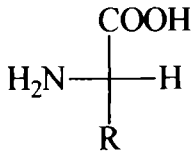
Familie sterică	Formula stereochimică simplificată	Formula de proiecție plană Fischer	Configurația atomului de Cα
D			R
L			S

Fig.II.1 – Familiile (seriile) sterice ale α-aminoacizilor

Proteinele naturale conțin ca unități constitutive exclusiv L-α-aminoacizi, în timp ce D-α-aminoacizii s-au izolat din unele forme inferioare de viață (surse microbiologice). Deosebirile structurale ale aminoacizilor sunt generate de asemenea şi de natura radicalului R.

II.2. Nomenclatură şi clasificare

α-Aminoacizii pot fi desemnați atât printr-o nomenclatură rațională cât şi prin denumiri uzuale, particulare. Spre deosebire de alte clase de substanțe, în cazul α-aminoacizilor denumirile uzuale sunt acceptate unanim în limbajul curent, datorită uşurinței de exprimare, scriere şi utilizare a unor simboluri convenționale (tabel II.1).

În literatura de specialitate, aminoacizii sunt clasificați pe baza mai multor criterii:

-după numărul de grupe NH_2 şi COOH din moleculă (mono- şi dicarboxilici, mono- şi diaminoacizi etc.);

-după poziția grupelor funcționale din moleculă (α, β, γ, δ, ε-aminoacizi);

-după structura chimică a radicalului R (aminoacizi alifatici, aromatici, heterociclici etc.);

-după polaritatea radicalului R (aminoacizi cu grupa R polară sau nepolară);

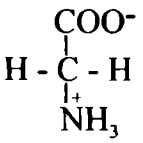
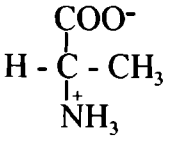
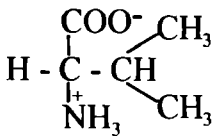
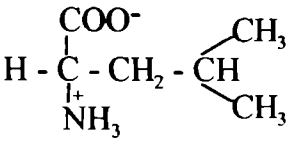
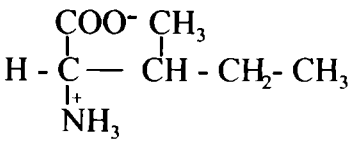
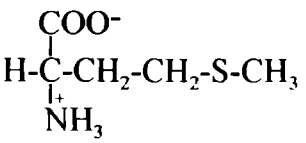
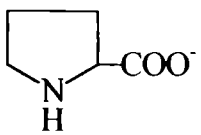
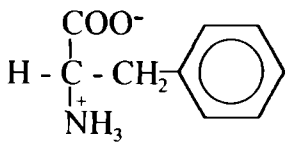
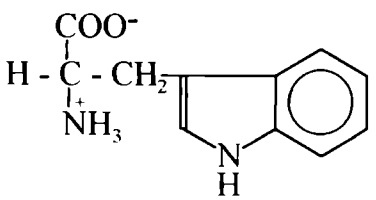
-după rolul biologic (aminoacizi esențiali şi neesențiali).

II.2.1. Aminoacizi naturali "standard"

Pentru cei 20 de α-aminoacizi naturali ("standard") din proteine este prezentată în tabelul nr.1 clasificarea în funcție de polaritate, specificându-se şi prescurtările convenționale corespunzătoare din trei litere, utilizate în literatura biochimică.

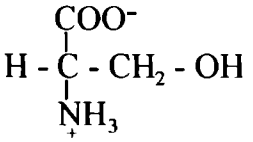
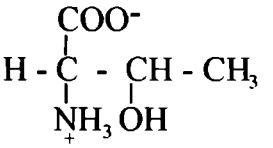
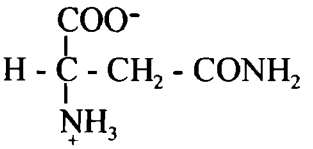
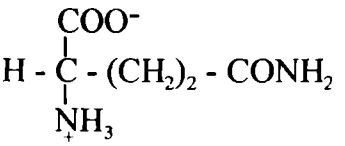
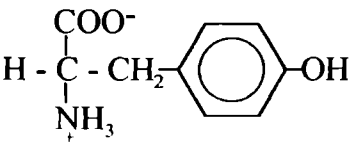
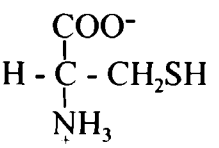
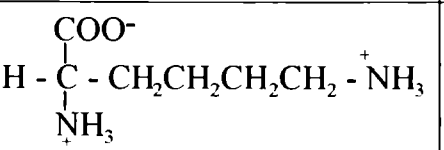
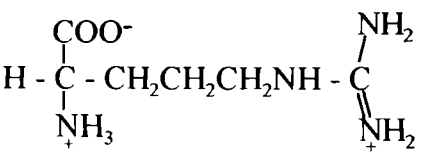
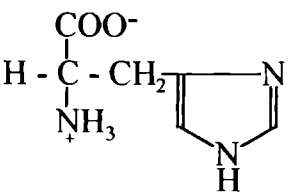
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabelul II.1 – Clasificarea α-aminoacizilor naturali ("standard") după polaritatea moleculelor

Nr. crt.	Numele	Formula structurală (forma ionizată)*	Simbol	Conținutul mediu în proteine (%)	Punct izoelectric
I	Aminoacizi cu catene nepolare				
1	Glicină (glicocol) (acid aminoacetic)		Gly	7,5	5,97
2	L-Alanină (acid α-aminopropionic)		Ala	9,0	6,02
3**	L-Valina (acid α-amino-izovalerianic)		Val	6,9	5,97
4**	L-Leucina (acid α-aminoizocaproic)		Leu	7,5	5,98
5**	L-Izoleucina (acid α-amino-β-metilvalerianic)		Ile	4,6	6,02
6**	L-Metionina (acid 2-amino-4-metil-mercaptobutiric)		Met	1,7	5,75
7	L-Prolina (acid pirolidin-α-carboxilic)		Pro	4,6	6,10
8**	L-Fenilalanina (acid α-amino-β-fenilpropionic)		Phe	3,5	5,98
9**	L-Triptofan (acid α-amino-β-indolilpropionic)		Trp	1,1	5,98

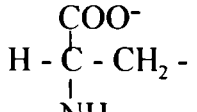
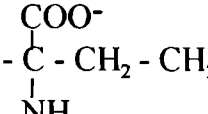
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabelul II.1 (continuare)

Nr. crt.	Numele	Formula structurală (forma ionizată)*	Simbol	Conținutul mediu în proteine (%)	Punct izoelectric
II	Aminoacizi cu catene polare fără sarcini electrice				
10	L-Serina (acid α-amino-β-hidroxipropionic)		Ser	7,1	5,68
11**	L-Treonina (acid α-amino-β-hidroxibutiric)		Thr	6,0	6,53
12	L-Asparagina (amida acidului aspartic)		Asn	4,4	5,41
13	L-Glutamina (amida acidului glutamic)		Gln	3,9	5,61
14	L-Tirozina acid α-amino-β-[(p-hidroxifenil)-propionic]		Tyr	3,5	5,65
15	L-Cisteina (acid α-amino-β-mercaptopropionic)		Cys	2,8	5,02
16**	L-Lisina (acid α,ε-diamino-caproic)		Lys	7,0	9,74
17	L-Arginina (acid α-amino-δ-guanidinvalerianic		Arg	4,7	10,76
18	L-Histidina (acid α-amino-β-imidazolil-propionic)		His	2,1	5,78

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabelul II.1 (continuare)

Nr. crt.	Numele	Formula structurală (forma ionizată)*	Simbol	Conținutul mediu în proteine (%)	Punct izoelectric
19	Acid L-aspartic (acid α-amino-succinic)		Asp	5,5	2,97
20	Acid L-glutamic (acid α-amino-glutaric)		Glu	6,2	3,22

* La pH =7,0 predomină formele ionizate

** Aminoacizi esențiali

II.2.2. Aminoacizi "nestandardizați" (mai rar întâlniți în proteine)

Cei 20 de α-aminoacizi naturali "standard" sunt singurii existenți în toate proteinele naturale. În afară de aceştia, mai există un număr de aminoacizi "nestandardizați" care apar în unele proteine şi polipeptide biologic active, din care au fost izolați (tabel II.2).

În toate cazurile cunoscute, aceşti aminoacizi rezultă prin modificarea specifică a resturilor de aminoacizi "standard", după biosinteza lanțului polipeptidic al proteinelor. Astfel, ca rezultat al modificării resturilor de aminoacizi, se formează 4-hidroxiprolina şi 5-hidroxilisina, constituenți structurali importanți ai proteinei fibroase colagen.

Aminoacizii din proteinele implicate în complexe cu acizii nucleici pot fi modificați. Astfel, proteinele ribozomiale şi cromozomiale pot suferi metilări, acetilări şi/sau fosforilări specifice.

În tabelul II.2 este prezentată o selecție a acestor resturi de aminoacizi modificați. De exemplu, N-formilmetionina este inițial restul N-terminal al tuturor proteinelor procariotice, dar este îndepărtat frecvent în cursul procesului de maturizare a proteinei.

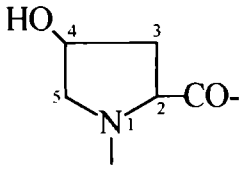
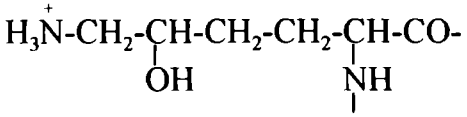
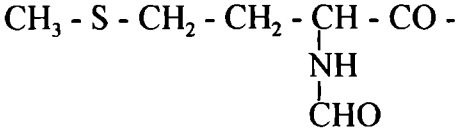
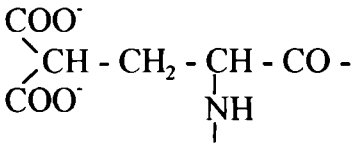
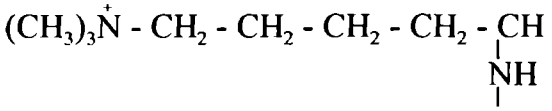
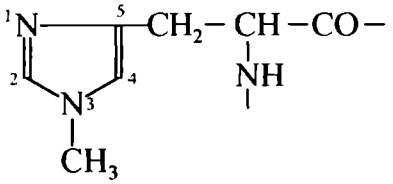
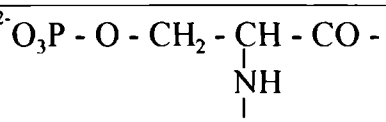
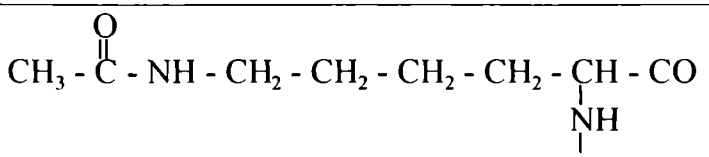
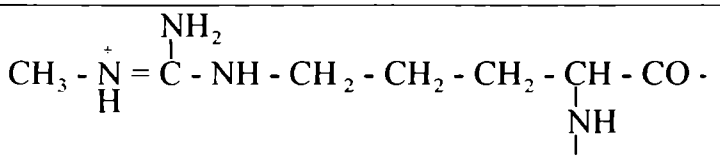
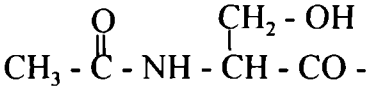
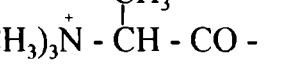
Acidul γ-carboxiglutamic este constituent al unor proteine implicate în coagularea sângelui.

Anumite proteine musculare conțin ε-N-trimetil-lisina şi N-metil-histidina, ca derivați ai aminoacizilor din proteine.

Desmozina şi izodesmozina sunt derivați ai lisinei, care rezultă printr-o condensare intermoleculară complexă a patru molecule de lisină, cu participarea radicalilor R, având ca rezultat formarea ionului de piridiniu. Structura desmozinei şi izodesmozinei (cu patru catene laterale grefate pe nucleul piridinic) le conferă acestora posibilitatea de a lega patru catene polipeptidice, într-un aranjament radial. Asemenea aranjamente sunt specifice elastinei, proteina fibroasă din țesuturile de legătură elastice ale ligamentelor.

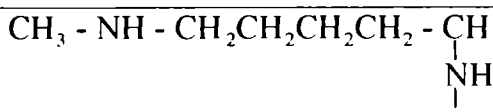
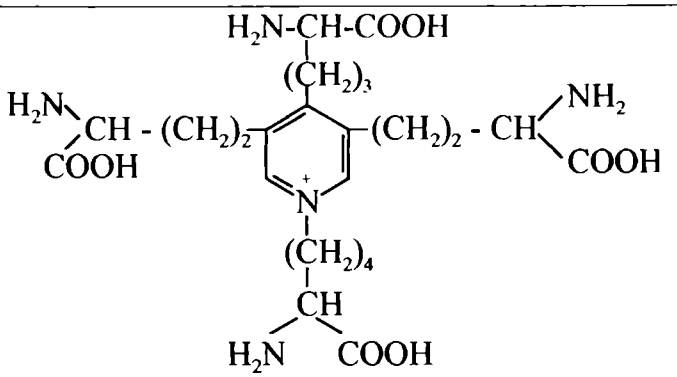
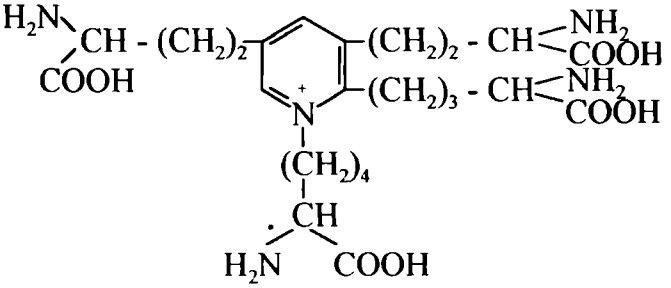
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabelul II.2 – Resturi de aminoacizi "nestandardizaţi" din unele proteine

Nr. crt.	Denumirea restului de aminoacid	Structură
1	4-Hidroxiprolina	
2	5-Hidroxilisina	
3	N-Formilmetionina	
4	γ-carboxiglutamat	
5	N, N, N-Trimetil-lisina	
6	3-Metil-histidina	
7	O-Fosfoserina	
8	ε-N-Acetil-lisină	
9	ω-N-Metil-arginină	
10	N-Acetil-serina	
11	N,N,N-Trimetil-alanina	

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabelul II.2 (continuare)

Nr. crt.	Denumirea restului de aminoacid	Structură
12	ε-N-Metil-lisina	
13	Desmozina	
14	Izodesmozina	

II.2.3. Aminoacizi naturali "nestandardizați" neconstituenți ai proteinelor

Natura tinde să-şi adapteze materialele şi procesele odată cu apariția unor funcții noi, ca rezultat al evoluției materiei vii. Excluzând aminoacizii cu răspândire generală ("standard") sau sporadică ("nestandardizați") din componența proteinelor, rămâne un număr mare de aminoacizi liberi sau constituenți ai unor produşi naturali neproteici.

Spre deosebire de aminoacizii prezenți în proteine, care sunt exclusiv α-L-aminoacizi, aceşti acizi "nestandardizați" pot fi: α-L-, α-D-, β- sau γ-aminoacizi liberi sau prezenți în moleculele unor substanțe neproteice (tabel II.3).

Rolul acestor aminoacizi în organismele vii este, ca şi structura lor, de o mare diversitate, în unele cazuri el fiind fie necunoscut, fie greu de explicat.

Astfel, β-alanina este o componentă a acidului pantotenic, a coenzimei A, a carnozinei şi a anserinei.

Homoserina şi homocisteina intervin ca intermediari în metabolismul aminoacizilor, iar citrulina şi ornitina – ca intermediari în sinteza argininei.

Acidul djencolic, β-cianoalanina şi canavanina prezintă o acțiune toxică față de alte forme de viață, diferite de cele în care sunt prezenți.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Unii aminoacizi şi derivaţii lor joacă rolul de mesageri chimici în comunicarea dintre celule. Asfel, glicina, acidul γ-amino-butiric (GABA) produs prin decarboxilarea glutamatului şi dopamina (un derivat al tirozinei) sunt neurotransmiţători.

Histamina (produsă prin decarboxilarea histidinei) este un mediator local al reacţiilor alergice; tiroxina (derivată de la tironină) este un hormon tiroidian care conţine iod, cu rol stimulator în metabolismul vertebratelor.

Alţi aminoacizi sunt intermediari importanţi în diverse procese metabolice. Astfel: citrulina şi ornitina sunt intermediari în biosinteza ureei; homocisteina este intermediar în metabolismul aminoacizilor; S-adenozilmetionina este un agent de metilare biologic etc.

Din plante şi fungi s-au izolat aproape 250 de aminoacizi diferiţi. În majoritatea cazurilor, rolul lor biologic este încă neelucidat, dar deoarece majoritatea sunt toxici, s-a tras concluzia că ar avea un rol de protecţie.

Unii dintre aceştia, ca azaserina, sunt utilizaţi în medicină ca antibiotice.

Majoritatea acestor aminoacizi sunt derivaţi simpli ai celor 20 de aminoacizi "standard", deşi unii dintre ei, ca azaserina şi β-cianoalanina au structuri neuzuale.

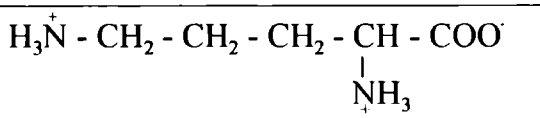
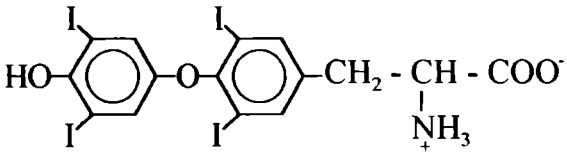
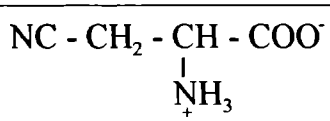
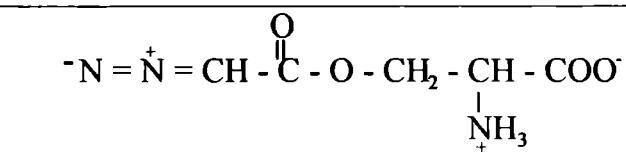
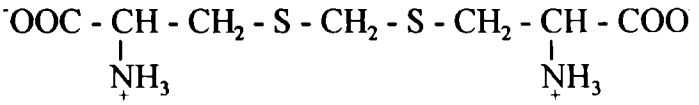
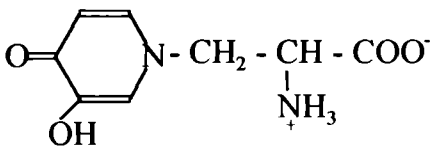
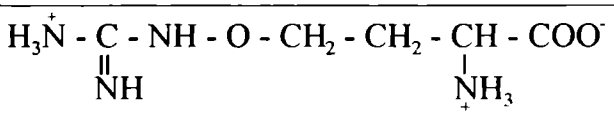
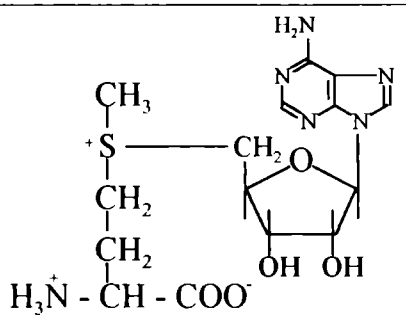
Deşi proteinele naturale conţin numai resturi de L-aminoacizi, în multe organisme sunt prezenţi D-aminoacizi. Aceşti compuşi, care sunt sintetizaţi direct, sunt în majoritatea cazurilor constituenţi ai membranelor celulare ale viruşilor şi bacteriilor. Deşi rolul lor este în general diferit, unii dintre D-aminoacizi accentuează vulnerabilitatea membranelor celulare microbiene la atacul peptidazelor, ceea ce explică de ce unele organisme produc digestia acestor membrane.

Tabelul II.3 – Aminoacizi naturali "nestandardizaţi", neconstituenţi ai proteinelor

Nr. crt.	Denumire	Structură
1	β-Alanina	$H_3\overset{+}{N} - CH_2 - CH_2 - COO^-$
2	Acid γ-aminobutiric (GABA)	$H_3\overset{+}{N} - CH_2 - CH_2 - CH_2 - COO^-$
3	Homocisteină	$HS - CH_2 - CH_2 - \underset{\overset{\vert}{\overset{+}{N}H_3}}{CH} - COO^-$
4	Homoserină	$HO - CH_2 - CH_2 - \underset{\overset{\vert}{\overset{+}{N}H_3}}{CH} - COO^-$
5	Citrulina	$H_2N - \overset{\overset{O}{\Vert}}{C} - NH - CH_2 - CH_2 - CH_2 - \underset{\overset{\vert}{\overset{+}{N}H_3}}{CH} - COO^-$

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabelul II.3 (continuare)

Nr. crt.	Denumire	Structură
6	Ornitina	
7	Tiroxina	
8	β-Cianoalanina	
9	Azaserina	
10	Acid djencolic	
11	Mimosina	
12	Canavanina	
13	S-Adenozilmetionina	

II.3. Proprietățile aminoacizilor prezenți în proteine

Cu excepția prolinei (care este de fapt un α-iminoacid), toți ceilalți aminoacizi "standard" conțin o grupă NH_2 și una COOH în poziția α (sunt deci α-aminoacizi propriu-ziși).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

II.3.1. Proprietăţile fizice ale aminoacizilor

α-Aminoacizii prezintă o caracteristică deosebit de importantă pentru rolul lor biologic: în intervalul de pH fiziologic, ambele grupe funcţionale din α (NH_2 şi COOH) sunt ionizate.

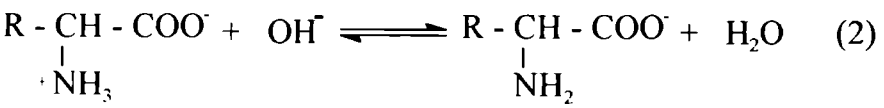
În tabelul II.4 sunt indicate valorile pK pentru aceste grupe.

Tabelul II.4 – Valori ale pK pentru grupele ionizante din α-aminoacizii "standard", la 25°C

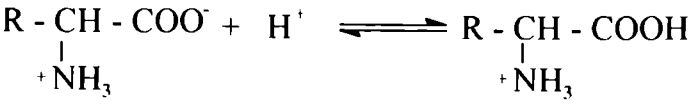
Nr. crt.	α-Aminoacidul	pK_1 α-COOH	pK_2 $\alpha-\overset{+}{N}H_3$	pK_R catenă
1	Ala	2,35	9,87	
2	Arg	1,82	8,99	12,48 (guanidino)
3	Asn	2,1	8,84	
4	Asp	1,99	9,90	3,90 (β-COOH)
5	Cys	1,92	10,78	8,33 (sulfhidril)
6	Glu	2,10	9,47	4,07 (γ-COOH)
7	Gln	2,17	9,13	
8	Gly	2,35	9,78	
9	His	1,80	9,33	6,04 (imidazol)
10	Ile	2,32	9,76	
11	Leu	2,33	9,74	
12	Lys	2,16	9,18	10,79 ($\varepsilon-\overset{+}{N}H_3$)
13	Met	2,13	9,28	
14	Phe	2,16	9,18	
15	Pro	2,95	10,65	

Aşadar, structura corectă a unui aminoacid este cea ionizată:

În consecinţă, aminoacidul poate funcţiona fie ca un acid (2), fie ca o bază (3):



(2)



(3)

Cu toate acestea, se observă că, adăugând la soluţia apoasă a unui aminoacid ioni OH^- sau H^+, pH -ul soluţiei nu suferă modificări apreciabile (fig.II.3).

De aceea, soluţiile de aminoacizi se utilizează frecvent pentru tamponarea unor medii de reacţie în sinteza organică, în biochimie, în chimia analitică, în farmacie etc.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Aminoacizii sunt deci amfoliți (electroliți amfoterici). Deoarece cele două grupe funcționale din moleculă au polarități de semn contrar, rezultă o structură de amfion (ion dipolar). Caracterul amfionic al α-aminoacizilor a fost stabilit prin metode fizice de investigare a structurii lor (difracție cu raze X, spectroscopie etc.).

Astfel, spectrele IR de absorbție ale α-aminoacizilor nu conțin frecvența caracteristică $\nu_{C=O}$ din grupa COOH neionizată (la 1700-1724 cm^{-1}), ci o absorbție situată în domeniul 1400-1600 cm^{-1}. Acidulând soluția neutră a unui aminoacid, frecvența $\nu_{C=O}$ se deplasează la 1720 cm^{-1}. Acest lucru este în concordanță cu structura dipolară a aminoacizilor.

În ceea ce privește spectrele electronice de absorbție, α-aminoacizii naturali absorb, în general, în ultravioletul îndepărtat.

Un număr mic de aminoacizi prezintă absorbții caracteristice în ultravioletul apropiat (la pH =8, Trp și Tyr absorb la 275-280 nm, în timp ce Phe prezintă o absorbție slabă la 275-280nm, iar Cys are o absorbție și mai slabă la 240 nm).

Absorbțiile caracteristice Trp și Tyr (fig.II.2) sunt utilizate în mod frecvent pentru dozarea în soluție a proteinelor care conțin aceşti aminoacizi.

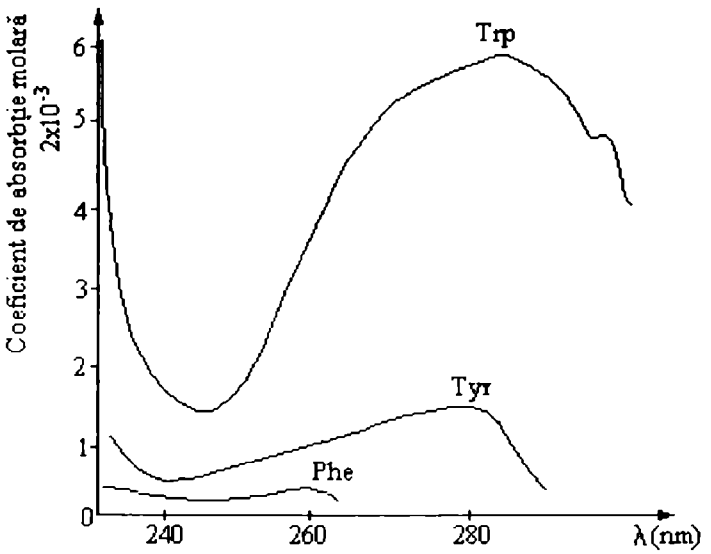


Fig.II.2 – Curbe de absorbție în UV a unor α-aminoacizi

De asemenea, aminoacizii prezintă momente electrice de dipol mari și măresc constanta dielectrică a apei în care sunt dizolvați.

Punctele de topire mari (peste 250°C) și densitățile ridicate ale aminoacizilor solizi sunt o consecință a forțelor cristaline de rețea puternice, datorită atracției electrostatice dintre sarcinile electrice de semn opus.

Contracția de volum (electrostricția) apărută la dizolvarea aminoacizilor în apă este foarte mare. De exemplu, la dizolvarea într-o cantitate mare de apă a unui mol de glicocol (75g), al cărui volum este 47ml, volumul soluției crește cu doar 43,5ml.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

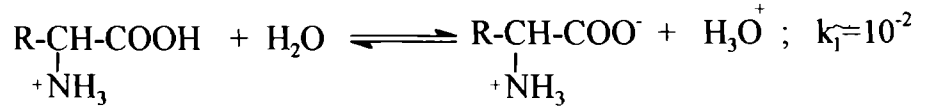
Acest fenomen este rezultatul apariției unor forțe de tip ioni-dipol între moleculele apei și ale aminoacidului (cu caracter ionic), care conduce la imobilizarea și comprimarea moleculelor de apă.

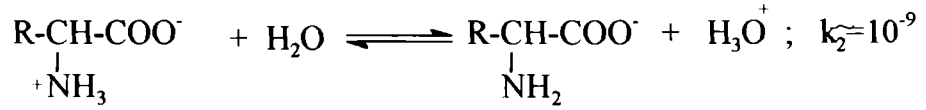
Structura amfionică a aminoacizilor justifică stabilitatea lor crescută în solvenți polari, față de comportarea în solvenți nepolari.

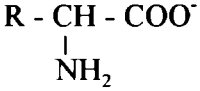
În consecință, α-aminoacizii sunt solubili în apă, dar prezintă o insolubilitate accentuată în majoritatea solvenților organici (mai ales în cei nepolari).

II.3.1.1. Punct izoelectric

Aminoacizii ale căror catene nu conțin grupe ionizabile sunt caracterizați prin două constante de ionizare, pentru care valorile pK sunt de ordinul 2 și respectiv 9:

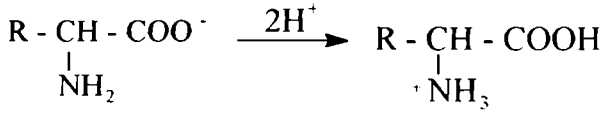




Deoarece $k_1 > k_2$, în soluția apoasă a aminoacidului, pe lângă un exces de amfioni, va exista și o mică concentrație de anioni 

Aminoacizii în soluție apoasă nu există deci exclusiv sub formă amfionică; rezultă că pH -ul soluției va fi diferit de cel al apei pure, existența anionilor determinând un pH slab alcalin. Datorită acestui fapt, dacă în soluție se introduc doi electrozi între care se aplică o diferență de potențial, se observă o migrare a ionilor spre electrozi (mobilitate electroforetică).

Pentru o anumită valoare de pH (caracteristică fiecărui aminoacid în parte), denumită punct izoelectric (pH_i), migrarea spre electrozi încetează, deoarece concentrațiile anionilor și cationilor din soluție devin identice, în urma titrării cu acid:



La punctul izoelectric soluția aminoacidului devine neutră, iar solubilitatea acestuia în apă este minimă.

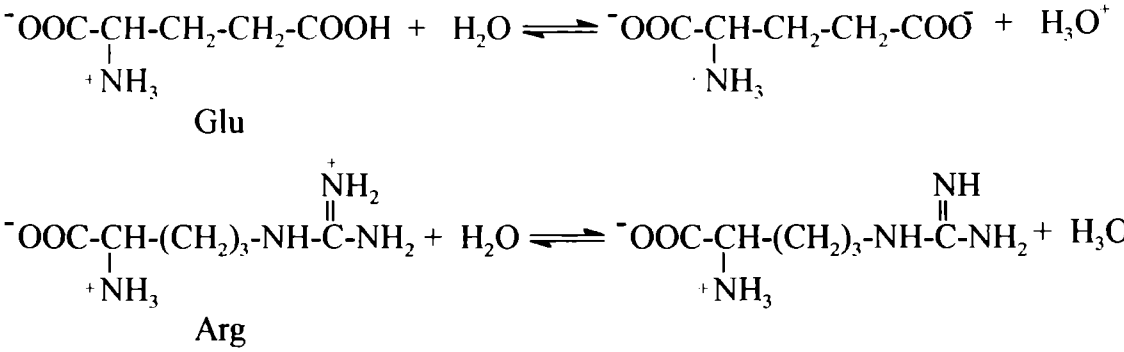
Această proprietate poate fi folosită la determinarea punctului izoelectric a unui aminoacid. Pentru aceasta, se trasează curbele solubilității aminoacidului în soluții bazice și acide, în funcție de pH. Punctul de întretăiere a celor două curbe corespunde pH_i.

În tabelul II.1 sunt indicate punctele izoelectrice ale α-aminoacizilor naturali "standard".

Aminoacizii care posedă în catenă grupe ionizabile prezintă și constante de ionizare caracteristice acestora (pK_R din tabelul II.4).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

De exemplu, catena laterală a acidului glutamic are $pK_R = 4,07$, iar cea a argininei – $pK_R = 12,48$:

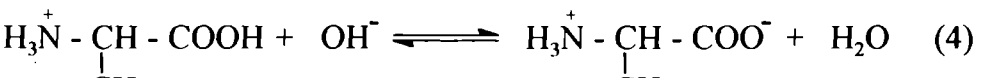


Glu

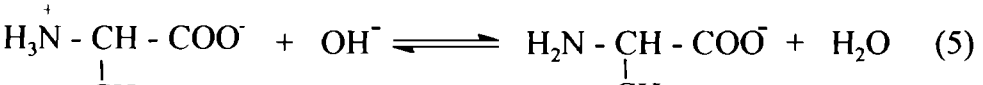
Arg

II.3.1.2. Titrarea soluțiilor apoase de aminoacizi

Datorită caracterului lor amfionic, aminoacizii monoamino-monocarboxilici pot fi considerați ca acizi bibazici. Titrarea lor completă cu hidroxizi alcalini are loc în două etape, consumându-se doi echivalenți de hidroxid, câte unul pentru fiecare etapă, ca în cazul alaninei:



(4)



(5)

Reprezentarea grafică, succesivă, a celor două etape de titrare: (4) şi (5) indică un punct de inflexiune la concentrația de un echivalent-bază, corespunzătoare punctului izolectric (fig.II.3).

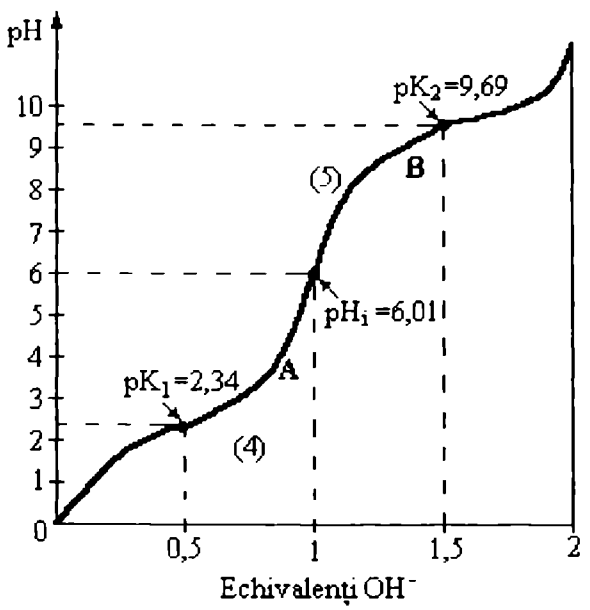


Fig.II.3 – Curba de titrare a alaninei cu NaOH

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Din fig.II.3 se observă trei puncte caracteristice:

- pH_i la care există în soluție numai specia amfionică $(H_3\overset{+}{N} - \underset{CH_3}{\underset{|}{CH}} - COO^-)$;

-pK_1 la care soluția conține cantități egale din speciile: $H_3\overset{+}{N} - \underset{CH_3}{\underset{|}{CH}} - COOH$ și $H_3\overset{+}{N} - \underset{CH_3}{\underset{|}{CH}} - COO^-$;

-pK_2 la care soluția conține cantități egale din speciile: $H_3\overset{+}{N} - \underset{CH_3}{\underset{|}{CH}} - COO^-$ și $H_2N - \underset{CH_3}{\underset{|}{CH}} - COO^-$

Fiecare segment de pe curbă este în concordanță cu ecuația Henderson – Hasselbach:

$$pH = pK + \log \frac{[acceptor]}{[donor]}$$

Această concordanță oferă posibilitatea calculării speciilor ionice la diverse valori de pH, date fiind valorile pK_1 și pK_2.

Din reprezentarea din fig.II.3, se mai observă și faptul că de o parte și de alta a punctelor de mijloc pK_1 și pK_2 există domenii destul de largi pe curbă în care variația concentrației bazei are ca rezultat variații minime de pH, ceea ce explică proprietatea de tamponare a aminoacizilor.

La valoarea punctului izoelectric (pH_i) apar proprietăți specifice ale aminoacizilor ca:

-solubilitate minimă;

-existența aminoacizilor exclusiv sub formă amfionică;

-dispariția proprietăților electroforetice.

În cazul acizilor monoamino-monocarboxilici, punctul izoelectric se poate deduce teoretic, fiind media aritmetică a constantelor pK_1 și pK_2 (tabelul II.4).

$$pH_i = \frac{1}{2}(pK_1 + pK_2)$$

În cazul aminoacizilor cu grupe ionizabile în restul hidrocarbonat (COOH, NH_2, guanidiniu, SH, imidazolil etc.), curbele de titrare se complică, deoarece la procesul titrării participă și ionii suplimentari, ceea ce duce la modificarea aspectului curbelor de titrare și a punctelor izoelectrice. În acest caz, la calcularea pH_i trebuie avută în vedere și contribuția acestor ioni suplimentari. Astfel, în tabelul II.4 se indică și valorile pK datorate grupelor ionizate din resturile hidrocarbonate ale α-aminoacizilor (notate cu pK_R).

Până acum a fost prezentat cazul titrării aminoacizilor individuali în soluție.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În practica biochimică, se impune însă adesea analizarea aminoacizilor în soluție, în prezența altor solute (reactanți, produși de reacție etc.). În aceste cazuri, constanta de disociere determinată experimental și denumită "constantă aparentă" (K') va fi diferită de constanta reală (K). Astfel, dacă titrarea α-aminoacizilor cu hidroxid de sodiu are loc în prezența unui exces de formaldehidă, se observă o modificare a curbei de titrare (metoda Sörensen).

Formaldehida reacționează cu grupa amino (neprotonată) a aminoacidului, conducând la monometilol- sau dimetilol-derivați (7):

$$H_3\overset{+}{N} - \underset{\underset{R}{|}}{CH} - COO^- \rightleftharpoons H_2N - \underset{\underset{R}{|}}{CH} - COO^- + H^+ \qquad (6)$$

$$H_2N - \underset{\underset{R}{|}}{CH} - COO^- + 2CH_2O \rightleftharpoons (HOCH_2)_2N - \underset{\underset{R}{|}}{CH} - COO^- \qquad (7)$$

În fig.II.4 este prezentat cazul titrării alaninei în prezența și în absența aldehidei formice.

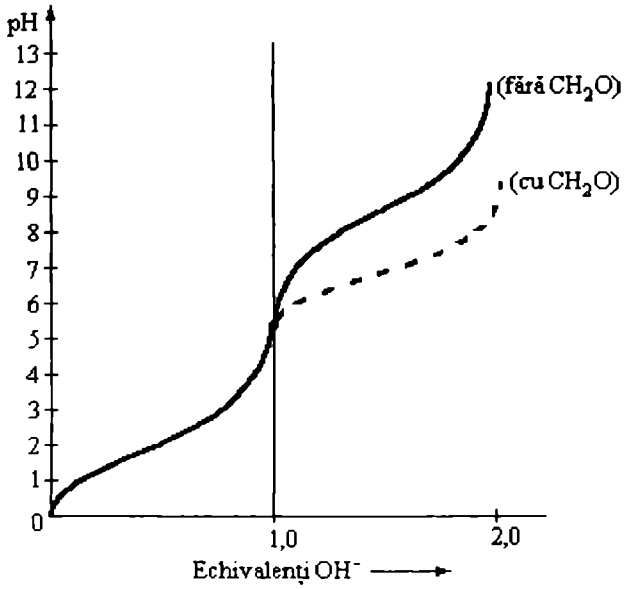


Fig.II.4 – Curbele titrării Sörensen a alaninei cu NaOH

Din relația (6) se observă că pentru fiecare moleculă de aminoacid (amfion) este eliberat în mediu un proton, care imprimă soluției un caracter acid, titrabil cu NaOH.

Din fig.II.4 se poate observa modificarea constantei pK_2 în prezența formaldehidei, cu deplasarea curbei spre valori mai mici de pH (pH = 6-8). Această comportare este utilizată pentru dozarea aminoacizilor prin metoda Sörensen, prin titrare în prezența formaldehidei, utilizând ca indicator fenoftaleina.

II.3.2. Proprietățile chimice ale aminoacizilor

În calitatea lor generală de molecule cu funcțiuni mixte, aminoacizii naturali prezintă proprietăți chimice legate de:

-prezența grupelor NH_2 și COOH din α;

-prezența unor grupe funcționale din catena hidrocarbonată R (fig.II.5).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

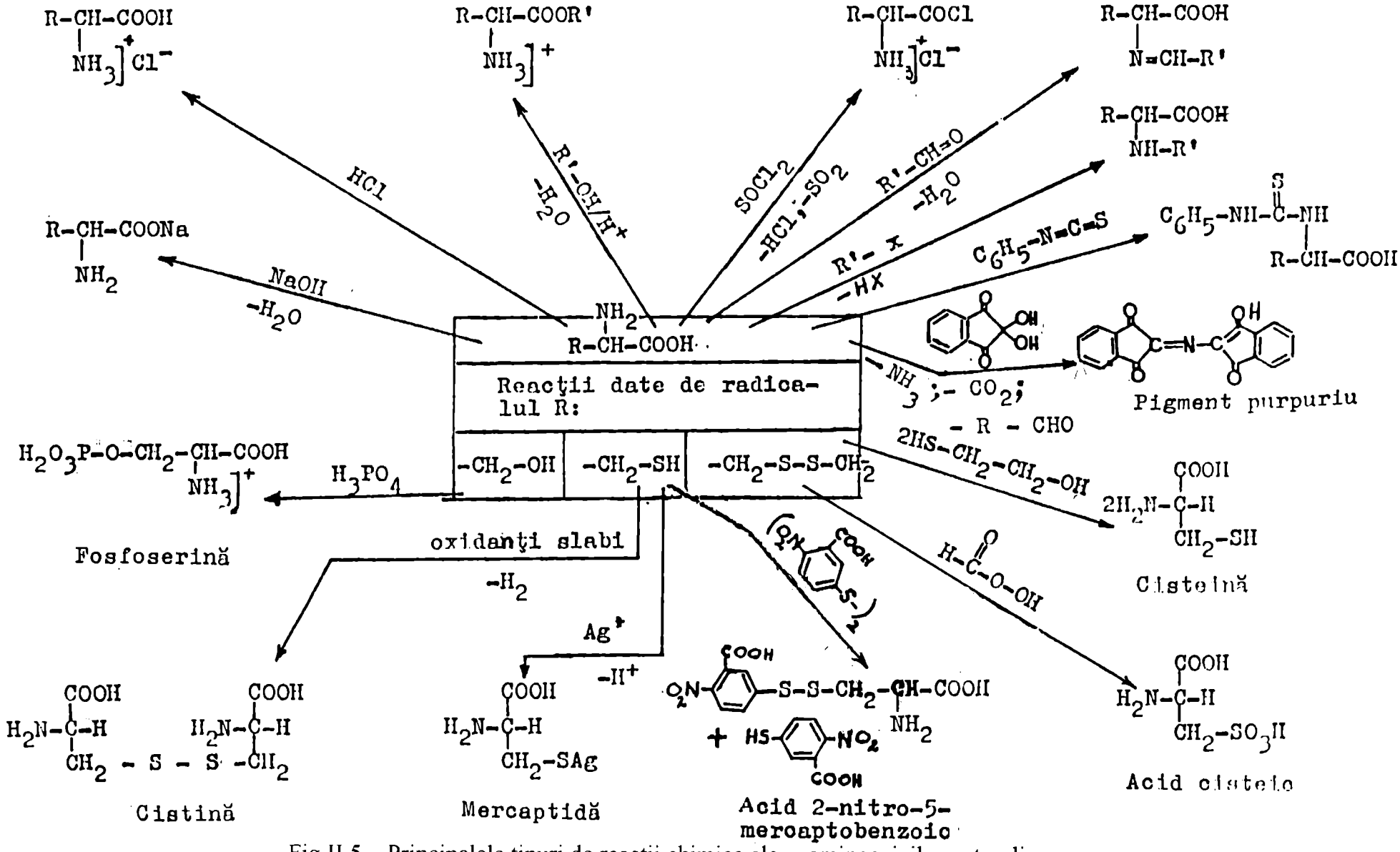


Fig.II.5 – Principalele tipuri de reacţii chimice ale α-aminoacizilor naturali

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

II.4. Transformările biochimice ale aminoacizilor

Sursa exogenă de aminoacizi o reprezintă proteinele din hrană, care sunt hidrolizate în cursul digestiei la aminoacizii componenți.

Dacă din cei 20 de aminoacizi naturali, cei neesențiali pot fi sintetizați de către organismele superioare (în principal prin transaminare), aminoacizii esențiali (tabelul II.1), nu pot fi biosintezați de aceste organisme, dar (fiind indispensabili acestora) trebuie introduşi pe cale exogenă.

Unii dintre aminoacizii naturali se pot substitui între ei. Astfel, tirozina poate fi biosintetizată din fenilalanină (dacă aceasta este în cantitate suficientă), iar cisteina se poate forma din metionină. În schimb, tirozina nu poate înlocui fenilalanina.

Capacitatea organismelor animale de a sintetiza aminoacizi diferă în funcție de specie sau chiar de vârstă. De exemplu, arginina nu poate fi sintetizată în cantitate suficientă de organismul în curs de creştere sau de cel slăbit de boală.

Principala utilizare a aminoacizilor proveniți din proteine pe cale exogenă este cea de biosinteză a proteinelor specifice organismului, necesare creşterii şi formării țesuturilor, ca şi sintezei de compuşi biologic activi cu conținut de azot (hem, amine fiziologic active, glutation, nucleotide şi coenzime nucleotidice, hormoni, enzime).

Aminoacizii rezultați în urma hrănirii cu proteine nu sunt stocați pentru o utilizare ulterioară şi sunt excretați doar într-o proporție redusă.Ei sunt mai curând convertiți la intermediari metabolici comuni, ca: piruvatul, oxaloacetatul şi α-cetoglutaratul.

Aminoacizii sunt şi precursori ai glucozei, acizilor graşi, ai corpilor cetonici şi chiar ai combustibililor metabolici.

În fig.II.6 sunt sumarizate principalele transformări biochimice ale aminoacizilor:

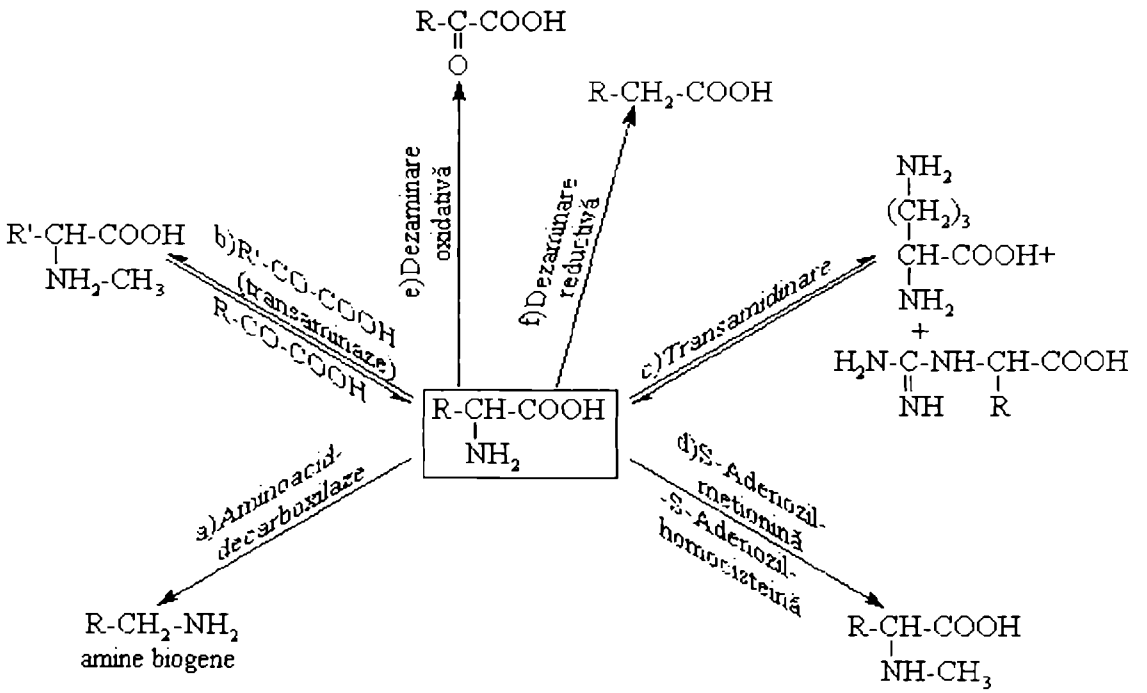


Fig.II.6 – Transformări biochimice ale aminoacizilor

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

II.4.1. Dezaminarea oxidativă a aminoacizilor

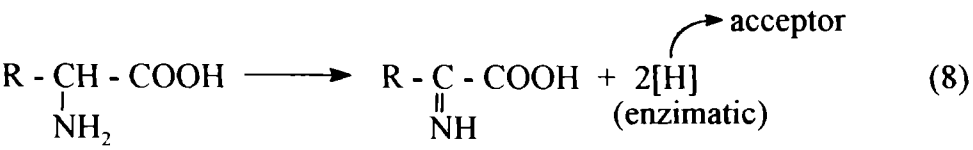
Aminoacizii în exces, proveniți din surse exogene sau din metabolismul normal al proteinelor, sunt dezaminați. Rezultă amoniac, eliminat sub formă de uree sau acid uric, iar restul organic este transformat în hidrați de carbon sau lipide, surse de energie pentru organism.

Organismul animal normal nu stochează proteine, aşa cum face rezerve de glicogen sau de grăsimi.

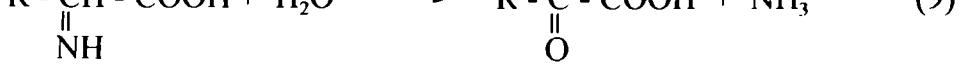
Dezaminarea oxidativă a aminoacizilor conduce în final la amoniac şi acizi α-cetonici. Formarea acestor cetoacizi a fost demonstrată în 1933 de către Krebs, prin tratarea unor α-aminoacizi cu felii de ficat sau de rinichi, care conțin enzimele (aminoacid oxidaze) capabile să catalizeze această reacție. Acizii α-cetonici obținuți au fost puşi în evidență sub formă de p-nitrofenilhidrazone.

Enzimele care catalizează dezaminarea sunt de mai multe tipuri: D-aminoacid oxidaze, L- aminoacid oxidaze şi aminoacid oxidaze specifice (dehidrogenaze).

Schema generală a dezaminării α-aminoacizilor indică existența a două secvențe (etape) reacționale, dintre care numai prima (8) este un proces enzimatic, decurgând în prezența unor coenzime ca acceptor de hidrogen:



(8)



(9)

Două aminoacidoxidaze nespecifice, L-aminoacid oxidaza şi D-aminoacid oxidaza catalizează oxidarea L- şi respectiv D-aminoacizilor, utilizând FAD ca acceptor de hidrogen:

$$\text{Aminoacid} + FAD + H_2O \longrightarrow \alpha\text{-Cetoacid} + NH_3 + FADH_2$$

$$FADH_2 + O_2 \longrightarrow FAD + H_2O_2$$

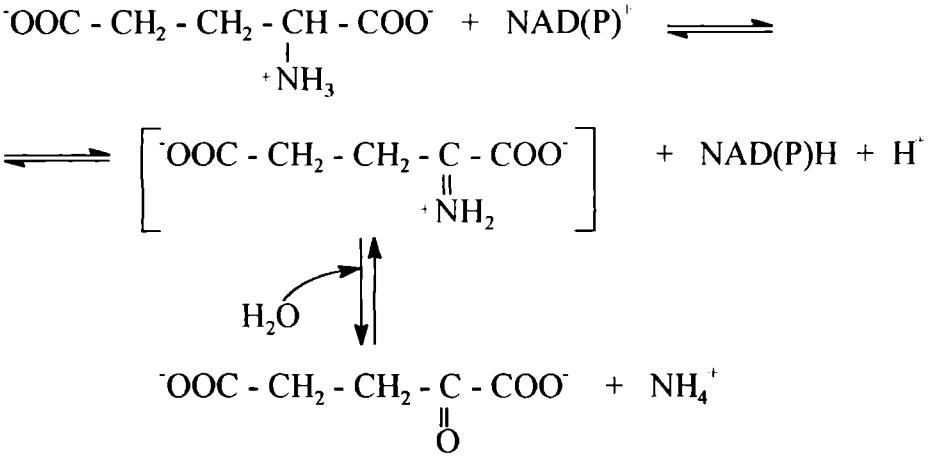
Rolul fiziologic al D-aminoacid oxidazelor nu este cunoscut întrutotul, D-aminoacizii apărând foarte rar în natură (asociați cu membranele celulelor bacteriene).

Se admite că D-aminoacizii sunt convertiți în α-cetoacizii corespunzători, care sunt apoi folosiți la biosinteza α-L-aminoacizilor prin transaminare.

L-aminoacid oxidazele însoțesc D-aminoacid oxidazele în diferite țesuturi. Astfel, au fost puse în evidență şi caracterizate L-aminoacid oxidaze în: veninul şarpelui, ficatul animalelor şi mucegaiuri.

În mitocondrii, glutamatul este dezaminat oxidativ sub acțiunea glutamat dehidrogenazei, care poate accepta NAD^+ sau $NADP^+$, în calitate de coenzime. Oxidarea decurge cu transferul unui ion de hidrură de la atomul Cα al glutamatului la $NAD(P)^+$, cu obținere de α-iminoglutamat, care este hidrolizat ulterior la α-cetoglutarat şi amoniac:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

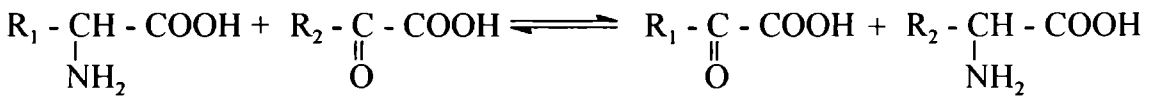


Glutamat dehidrogenaza este inhibată de GTP şi activată de ADP "in vitro", ceea ce sugerează că aceasta din urmă nucleotidă reprezintă un regulator pentru enzimă "in vivo".

Un număr mic de aminoacizi (ca serina şi histidina) sunt dezaminaţi neoxidativ.

II.4.2. Transaminarea aminoacizilor

Majoritatea aminoacizilor sunt dezaminaţi prin transaminare, proces în care are loc un transfer între grupa amino a unui α-aminoacid şi grupa cetonică a unui α-cetoacid:

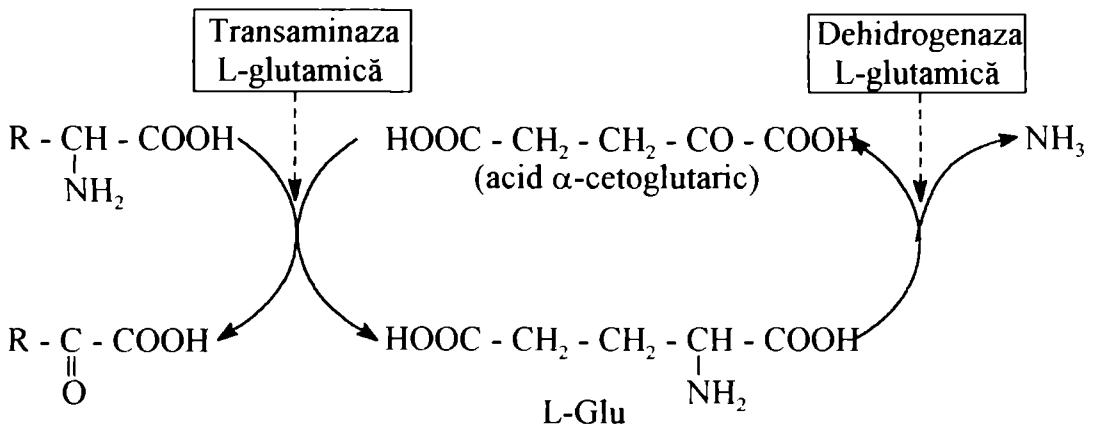


Reacţia este catalizată de aminotransferaze sau transaminaze, în prezenţa cotransaminazelor, derivate de la piridoxină (vitamina B6): fosfatul pridoxalului (PLP) şi fosfatul piridoxaminei (PMP).

Ca acceptor de grupă amino funcţionează în mod predominant α-cetoacidul:

α-Aminoacid + α-Cetoglutarat ⇌ α-Cetoacid + Glutamat

α-Cetoglutaratul se regenerează continuu (din acidul glutamic rezultat), prin degajare de amoniac, sub acţiunea dehidrogenazei L-glutamice:



Printr-o transaminare, grupa amino de la glutamat este transferată oxalilacetatului, cu formare de aspartat:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Gluatamat + Oxalilacetat $\rightleftharpoons$ α-Cetoglutarat + Aspartat

Reacțiile catalizate de aminotransferaze decurg în două secvențe principale:

a) transferul grupei amino de la aminoacid la enzimă:

Aminoacid + (E) $\rightleftharpoons$ α-Cetoacid + (E)–NH_2 ;

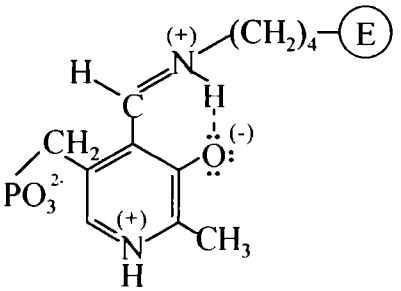
E = enzimă

b)urmează transferul grupei amino la cetoacidul acceptor (α-cetoglutarat) cu formarea aminoacidului corespunzător (glutamat) şi regenerarea enzimei:

α-Cetoglutarat + (E)–NH_2 $\rightleftharpoons$ Glutamat + (E)

Pentru protejarea grupei amino, aminotransferazele necesită participarea în calitate de coenzimă a piridoxal-5-fosfatului (PLP).

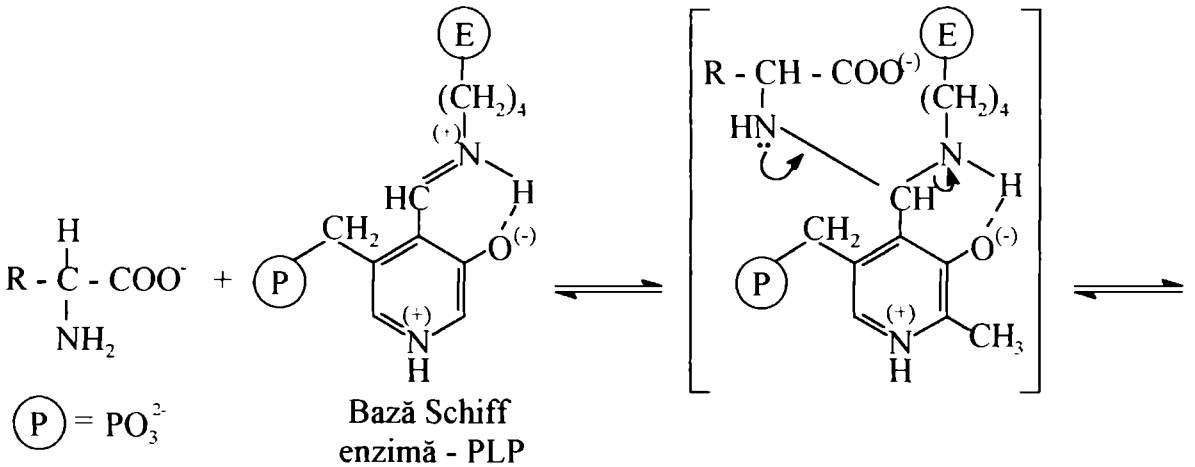
PLP este ataşat covalent de enzimă, prin intermediul unei legături azometimice (bază Schiff), formată prin condensarea grupei –CHO a PLP cu grupa $–NH_2$ din poziția ε a unui rest de lisină din enzimă:



Această bază Schiff focalizează activitatatea coenzimei.

Într-un stadiu ulterior, are loc conversia PLP în piridoxamin-5'-fosfat (PMP).

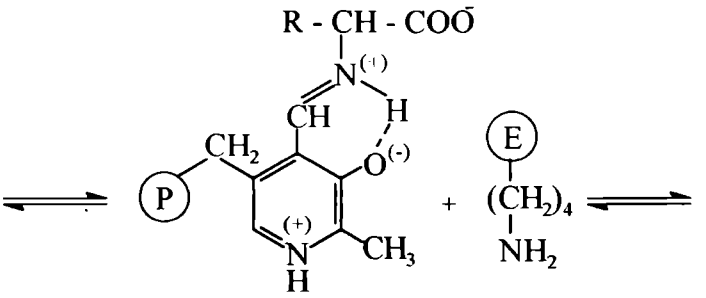
Schema generală a primei etape a reacției de transaminare va fi următoarea:



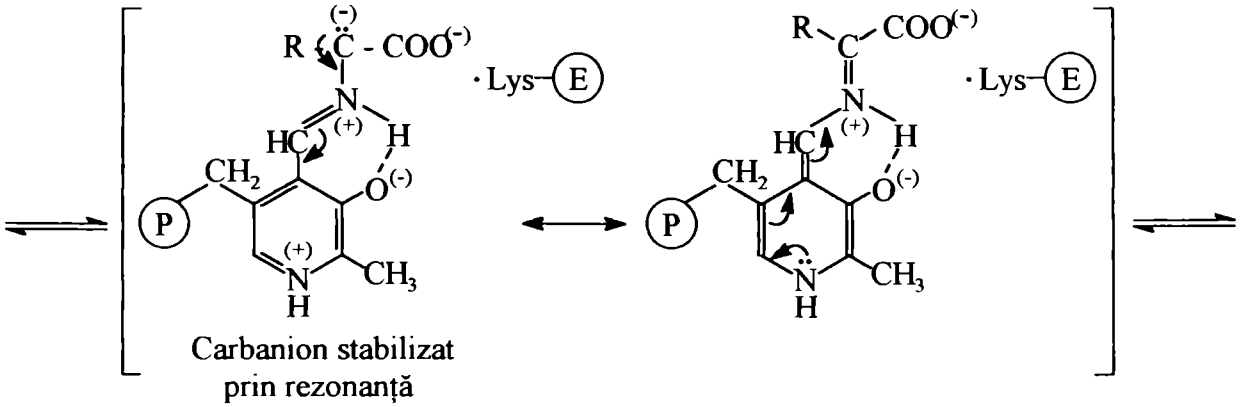
(P) = PO_3^{2-}

Bază Schiff
enzimă - PLP

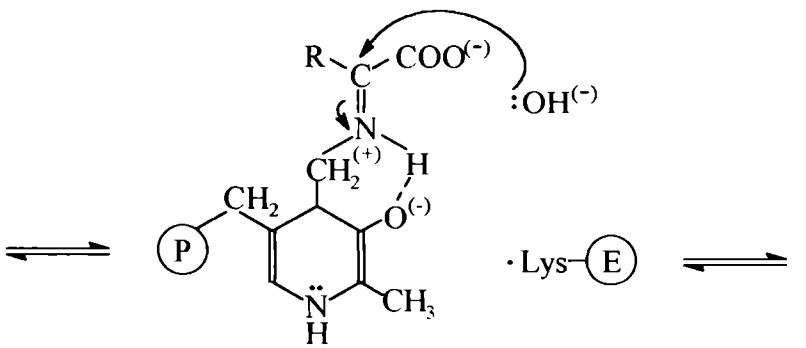
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

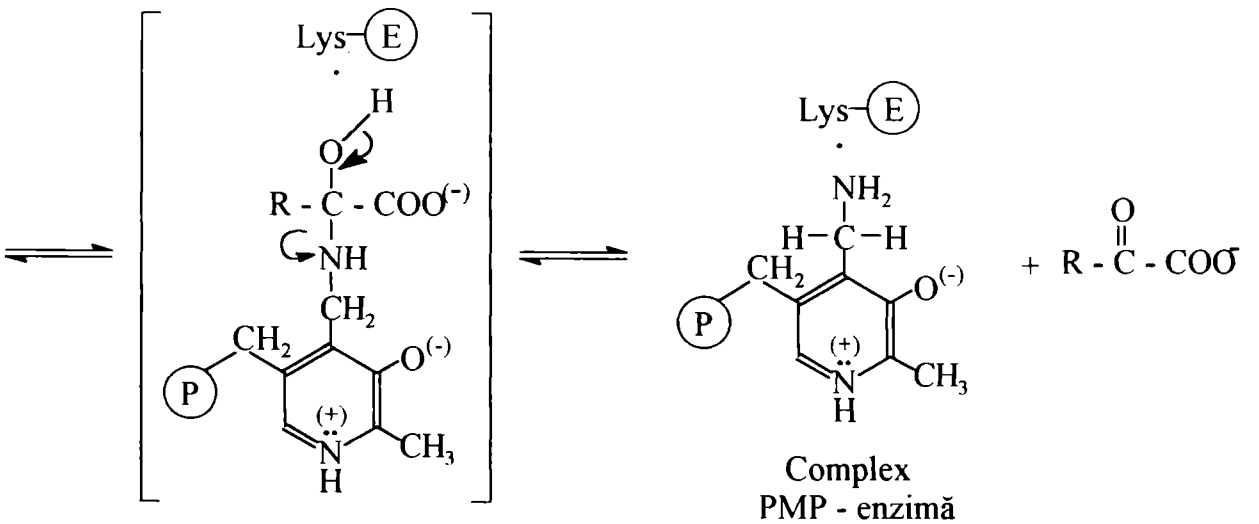


Bază Schiff
aminoacid - PLP
(aldimină)



Carbanion stabilizat
prin rezonanță





Complex
PMP - enzimă

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

A doua etapă a reacției este cea în care grupa amină de la PMP este transferată pe un cetoacid, conducând la un nou α-aminoacid şi PLP, fiind în esență reversul primei etape.

Sumarizând, cele două etape esențiale ale transaminării sunt descrise pe scurt în cele ce urmează.

A)Conversia unui α-aminoacid la un α-cetoacid:

-grupa NH_2 nucleofilă a aminoacidului atacă baza Schiff formată între enzimă şi PLP, cu formare de bază Schiff aminoacid-PLP şi eliberarea grupei NH_2 din restul de lisină al enzimei;

-baza Schiff aminoacid-PLP se tautomerizează la o bază Schiff α-cetoacid-PMP, cu formarea unui carbanion stabilizat prin rezonanță, ceea ce uşurează ruperea legăturii Cα-H din aminoacid;

-baza Schiff cetoacid-PMP se hidrolizează la PMP şi un α-cetoacid.

B)Conversia unui α-cetoacid la un α-aminoacid:

-PMP reacționează cu un α-cetoacid şi formează o bază Schiff;

-baza Schiff α-cetoacid-PMP se tautomerizează cu formarea unei baze Schiff α-aminoacid-PLP;

-grupa ε-NH_2 din restul de lisină al enzimei atacă baza Schiff α-aminoacid-PLP, cu eliberarea noului α-aminoacid format.

Prin transaminare organismul îşi biosintetizează numai α-aminoacizi neesențiali.

II.4.3. Reacții de decarboxilare a aminoacizilor

Decarboxilarea α-aminoacizilor este produsă de microorganisme. De exemplu, Bacterium coli şi Bacillus subtilis au proprietatea de a transforma α-aminoacizii în amine primare, denumite şi amine biogene:

$$R - \underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}} - COOH \longrightarrow CO_2 + R - CH_2 - NH_2$$

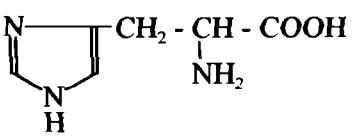
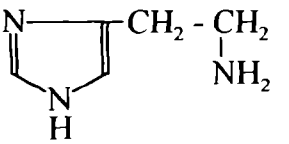
Decarboxilările sunt catalizate de aminoacid-decarboxilaze, având drept coenzimă piridoxal-fosfatul (PLP).

Aminele biogene formate au diverse funcții biologice ca: precursori sau intermediari în biosinteza unor coenzime, vitamine sau hormani; altele au acțiune farmacodinamică deosebită sau prezintă toxicitate etc.

În tabelul II.5 sunt indicate câteva exemple de amine biogene şi rolul lor biologic.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

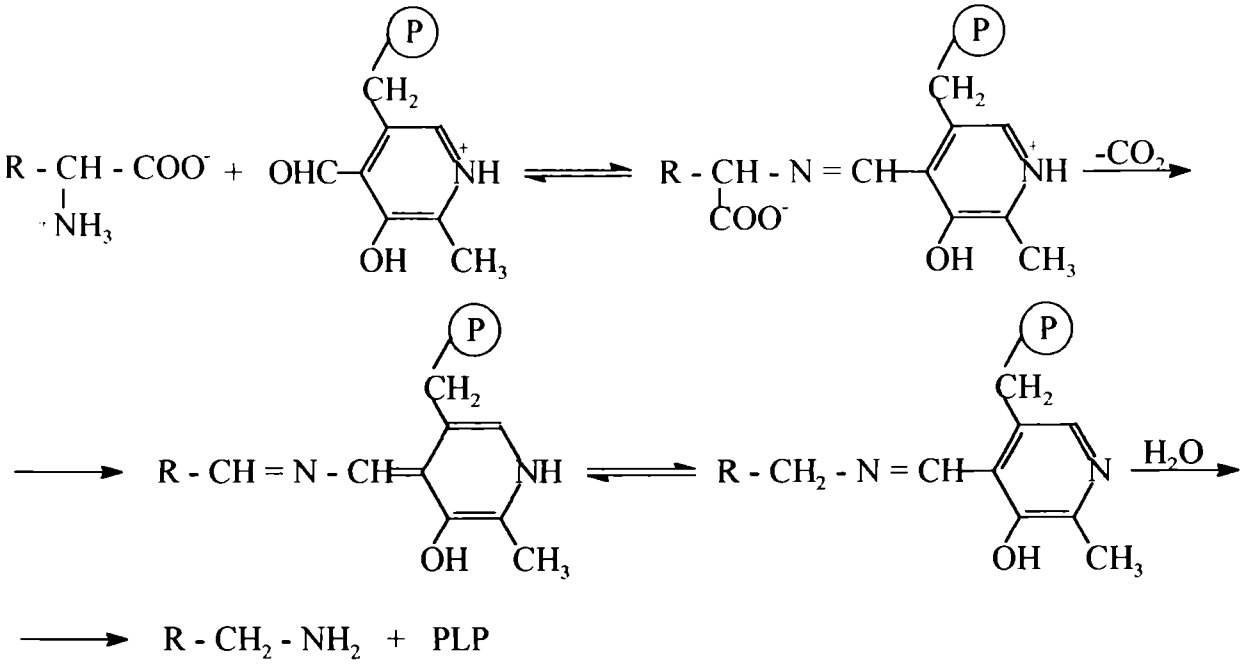
Tabelul II.5 – Amine biogene

Nr. crt.	Aminoacid Formulă/denumire	Enzimă	Amină biogenă Formulă/denumire	Acțiune sau funcție bilogică
1	$H_2N - (CH_2)_3 - CH(NH_2) - COOH$ Ornitină	Ornitin-decarboxilază	$H_2N - (CH_2)_4 - NH_2$ Putresceină	Acțiune toxică
2	$H_2N - (CH_2)_4 - CH(NH_2) - COOH$ Lisină	Lisin-decarboxilază	$H_2N - (CH_2)_5 - NH_2$ Cadaverină	Acțiune toxică
3	$CH_2(NH - C(=NH)NH_2) - (CH_2)_2 - CH(NH_2) - COOH$ Arginină	Arginin-decarboxilază	$H_2N - C(=NH) - NH(CH_2)_4 - NH_2$ Agmatină	Precursor în biosinteza sperminei şi a spermidinei din celulele bacteriene şi animale
4	 Histidină	Histidin-decarboxilază	 Histamină	Acțiune vasodilatatoare (efect hipotensiv)
5	$HS - CH_2 - CH(NH_2) - COOH$ Cisteină		$HS - CH_2 - CH_2 - NH_2$ Cisteamină	Componentă structurală a coenzimei A
6	$HOOC - CH_2 - CH(NH_2) - COOH$ Acid aspartic	Aspartat decarboxilază	$HOOC - CH_2 - CH_2 - NH_2$ β-Alanină	Componentă structurală a CoA-SH, acidului pantotenic şi dipeptidelor naturale - carnozina şi anserina

Aminoacid-decarboxilazele au specificitate pentru fiecare α-aminoacid.

Decarboxilarea are loc probabil printr-un intermediar bază Schiff aminoacid-PLP, asemănător cu cele de la transaminare.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

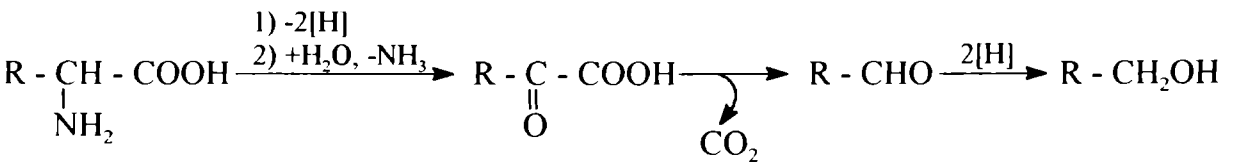


II.4.4. Dezaminare şi decarboxilare simultane

Aceste transformări simultane au loc sub influenţa drojdiei de brutărie.

Aminoacizii prezenţi în mediul de fermentaţie alcoolică (provenind din proteinele conţinute în materia primă supusă fermentaţiei) suferă o degradare specifică, cu obţinere de alcooli primari cu un atom de carbon mai puţin faţă de aminoacidul iniţial.

Este probabil că, în prezenţa complexului enzimatic din drojdie, are loc o dezaminare până la un acid α-cetonic, care este decarboxilat sub influenţa carboxilazei şi cocarboxilazei şi redus ulterior, după schema obişnuită a fermentaţiei alcoolice:

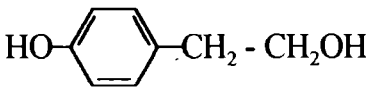
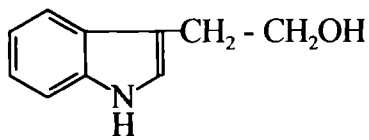


Astfel, în cozile de la distilarea alcoolului etilic de fermentaţie sunt prezenţi: alcoolul izoamilic (rezultat din leucină), alcoolul amilic optic activ (rezultat din izoleucină) şi izobutanolul (rezultat din valină).

În tabelul II.6 sunt trecuţi în revistă câţiva alcooli primari rezultaţi prin fermentaţia aminoacizilor cu drojdie.

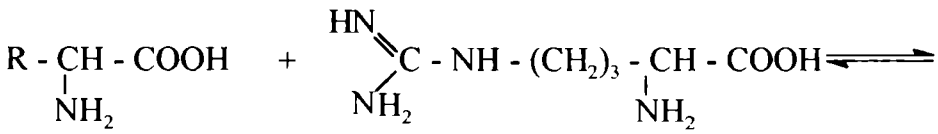
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabelul II.6 – Alcooli primari rezultați prin fermentarea unor α-aminoacizi cu drojdie

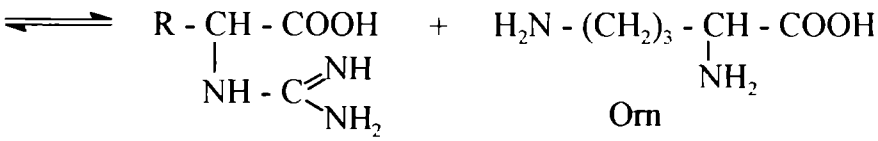
Nr. crt.	Aminoacid	Alcoolul rezultat
1	Leu	$(CH_3)_2CH - CH_2 - CH_2OH$
2	Ile	$C_2H_5 - \underset{\displaystyle CH_3}{\underset{\vert}{CH}} - CH_2OH$
3	Val	$(CH_3)_2\underset{\displaystyle CH_3}{\underset{\vert}{CH}} - CH_2OH$
4	Tyr	 Tyrosol
5	Trp	 Triptofol

II.4.5. Reacții de transamidinare

Aceste reacții au loc în organismele vii sub acțiunea transamidinazelor, care catalizează transferul grupei amidinice din arginină pe molecula altui aminoacid:



Arg

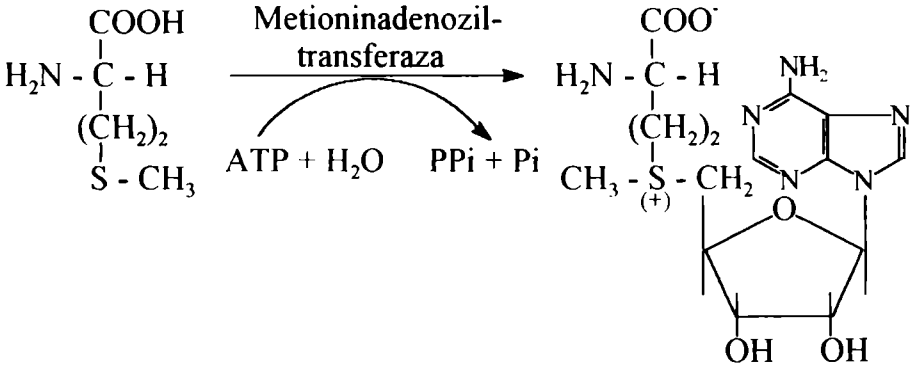


Orn

II.4.6. Reacții de transmetilare

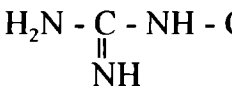
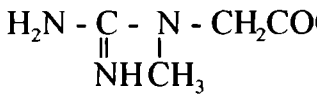
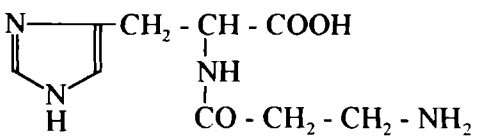
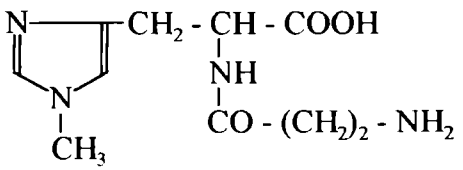
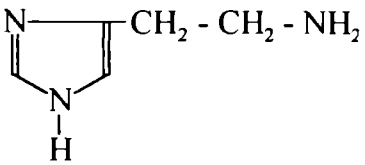
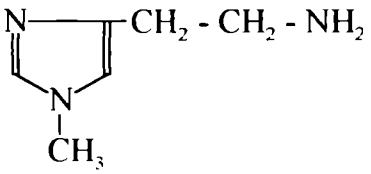
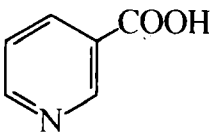
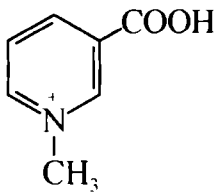
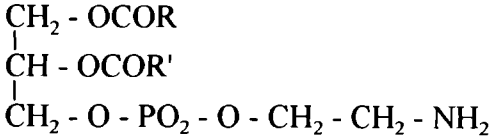
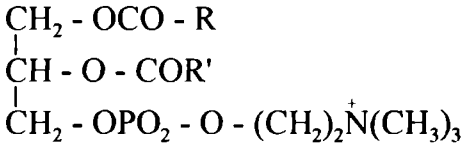
Transmetilările implică transferul grupei CH_3 de pe un donor pe un acceptor, sub influența metiltransferazelor. Ca donor de grupe metil funcționează frecvent S-adenozil-metionina, care se formează din metionină și ATP:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



În calitate de acceptori de grupe CH_3 în reacțiile de transmetilare pot funcționa substrate chimice cu structuri diverse (tabelul II.7).

Tabelul II.7 – Exemple de reacții de transmetilare

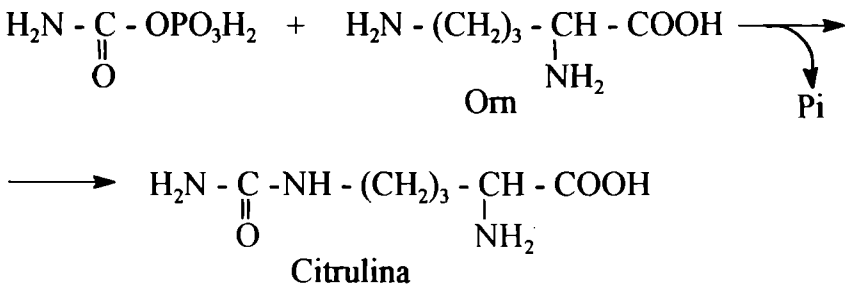
Nr. crt.	Acceptorul Formulă/denumire	Enzima	Compusul metilat
1	 Acid guanidin acetic	Guanidin-acetat-metil-transferaza	 Creatină
2	 Carnozină		 Anserină
3	 Histamină		 Metilhistamină
4	 Acid nicotinic		 Trigonelină
5	 Fosfatidiletanolamină		 Fosfatidilcolină

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

II.4.7. Alte transformări biochimice ale aminoacizilor

1° Dezaminarea reductivă a α-aminoacizilor conduce la acizi graşi saturați, sub influența unor reductaze (dehidrogenaze) specifice.

2° O secvență importantă din ciclul ureei (fig.II.7), prin care majoritatea vertebratelor terestre pot elimina excesul de azot rezultat din degradarea metabolică a aminoacizilor, este trans-carbamoilarea ornitinei cu carbamoil-fosfat în prezența enzimei ornitin-transcarbamoilaza (etapa 2 din fig.II.7):



Cum atât ornitina cât şi citrulina sunt α-aminoacizi "nestandardizați", această reacție nu poate avea loc în proteine. Reacția de trans-carbamoilare are loc în mitocondrii.

Ornitina produsă în citosol poate penetra membrana mitocondrială printr-un sistem transportor specific.

Cu toate că reacțiile din ciclul ureei decurg în citosol, citrulina poate fi expulzată din mitocondrii printr-un sistem transportor asemănător cu cel al ornitinei.

Sumarizând, în acest ciclu din fig.II.7, cele două grupe aminice ale ureei provin: una din amoniac şi cealaltă din aspartat; atomul de C al ureei provine din ionul HCO_3^-.

Astfel se formează ureea, un produs de excreție relativ netoxic.

Energia necesară ciclului ureei este furnizată de trei moli de ATP, care se transformă în: doi moli de ADP, doi moli P_i, AMP şi PP_i, acesta din urmă hidrolizându-se rapid.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

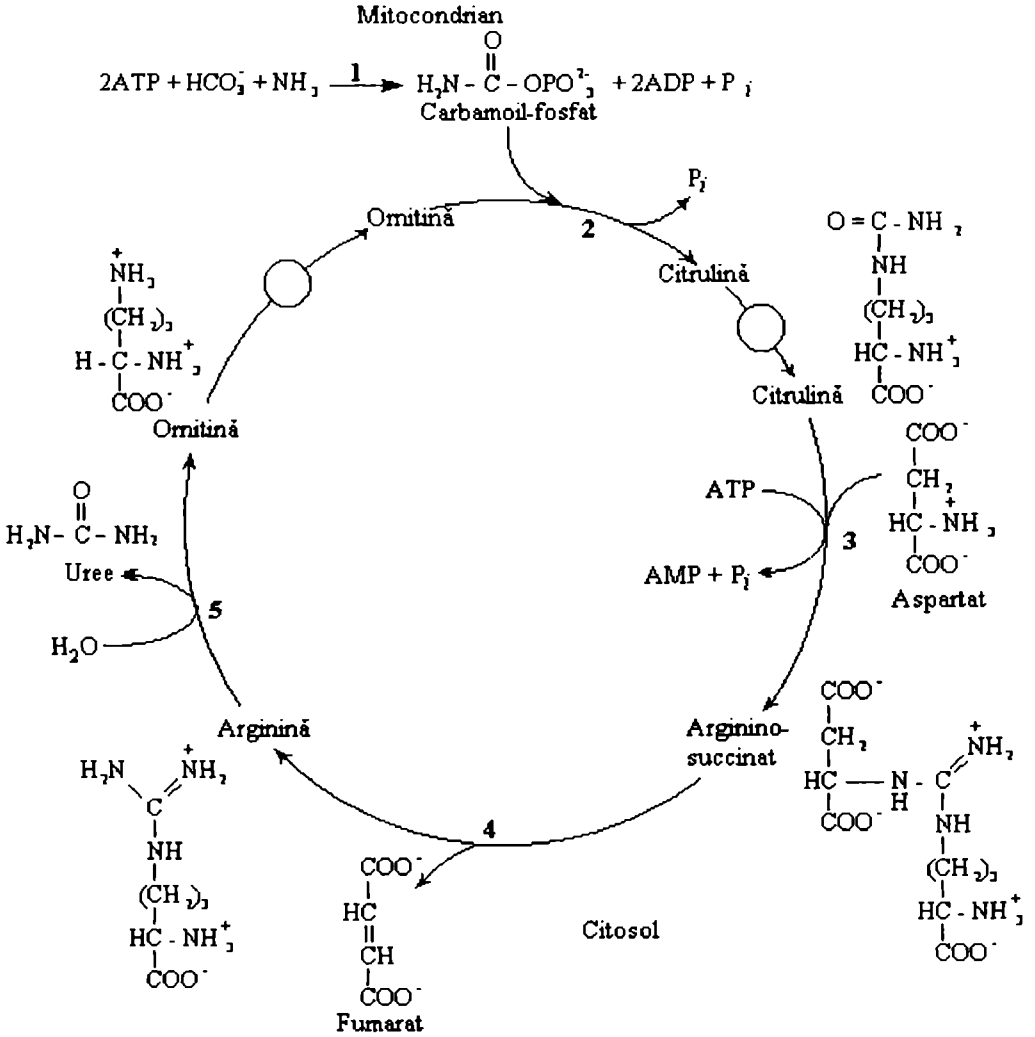


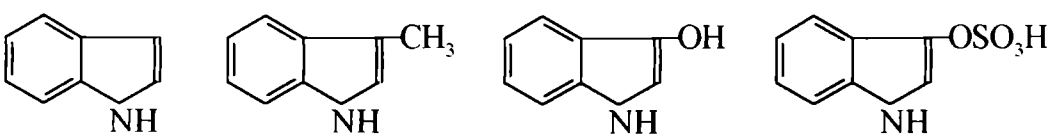
Fig.II.7 – Ciclul ureei

3° Degradări avansate ale aminoacizilor au loc sub acțiunea bacteriilor de putrefacție din intestinul gros. Astfel, prin oxidarea degradativă a catenelor laterale se pot forma:

-din tirosină – p-crezolul şi fenolul din excremente;

-din triptofan – scatolul (β-metilindol) şi indol, care determină mirosul fecalelor;

-din triptofan se formează şi β-indoxil, care se resoarbe în parte şi se elimină prin urină, sub formă de sulfat al β-indoxilului:



Indol Scatol β–Indoxil β–Indoxil-sulfat

-sulfatul fenolului, identificat în urină, este un produs de detoxifiere a fenolului provenit în mod asemănător din tirozină.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

II.5. Rolul biologic al aminoacizilor

Existența aminoacizilor liberi în organismul uman reprezintă o miză a echilibrului dintre metabolismul lor şi cel al proteinelor, aminoacizii fiind destinați a fi încorporați în proteine sau provenind din catabolismul acestora.

Fiecăruia dintre aminoacizi îi corespunde un metabolism specific prin care se formează. Aminoacizii plasmatici sunt filtrați la nivelul glomerulelor şi absorbiți parțial, datorită unui sistem complex de transportori (vezi cap. III).

Concentrațiile de aminoacizi sau de cataboliți ai acestora existente în urină şi sânge se determină printr-o mare varietate de metode chimice şi fizice: dozare cu reactivi specifici (ninhidrină, 2,4-dinitrofluorbenzen, reactiv Fehling etc.), cromatografie, spectroscopie, electroforeză, metode enzimatice şi microbiologice etc.

S-au pus la punct metode de dozare pentru fiecare aminoacid prezent în plasmă, sânge, ser şi urină, valorile fiziologice admise diferind în funcție de natura aminoacidului. Astfel, concentrațiile normale de aminoacizi din plasmă pot varia în cazul adulților între 0 μmoli/l (pentru hidroxiprolină) şi 415 μmoli/l (pentru alanină).

În cazul urinei, concentrațiile medii fiziologice pot fi cuprinse:

-la adulți – între 0 μmoli/l (pentru prolină şi hidroxiprolină) şi 1687 μmoli/l (pentru glicină);

-la copii – între 0 μmoli/l (pentru prolină şi hidroxiprolină) şi 670 μmoli/l (pentru glicină).

În general, animalele excretă excesul de azot provenit din degradarea metabolică a aminoacizilor pe trei căi:

a)Majoritatea animalelor acvatice simple elimină amoniac.

b)În cazul majorității vertebratelor terestre, la care apa este în cantitate mai mică, cea mai mare parte a amoniacului este convertit în uree (mai puțin toxică), care este excretată.

c)Un alt produs de excreție provenit din conversia amoniacului este acidul uric (pentru păsări şi reptile terestre).

Aşadar, pentru vertebratele terestre superioare (inclusiv omul), principalul metabolit excretat este ureea, formată prin ciclul ureei (fig.II.7). Ureea este sintetizată în ficat prin ciclul respectiv, pe cale enzimatică, după care trece în circulația sângelui şi este reținută de rinichi, fiind excretată prin urină.

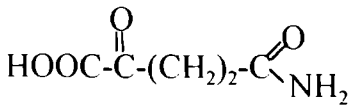
Eliminarea cotidiană de uree este influențată de aportul alimentar în proteine animale (carne). La adult, ea variază între 250 şi 500 μmoli/l. Variațiile patologice constau mai ales în diminuări ale acestor valori sub limita minimă şi sunt observate în cazul nefropatiilor. Determinările corelate de uree sanguină şi urinară sunt destinate explorării funcțiilor renale.

Un alt metabolit a cărui dozare poate da indicații asupra dereglării metabolismului proteinelor şi implicit al aminoacizilor, este amoniacul.

Amoniacul sanguin are o dublă origine: endogenă şi exogenă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În toate țesuturile (mai ales în ficat şi rinichi) amoniacul rezultă prin dezaminarea oxidativă a aminoacizilor, hidroliza glutaminei sau a acidului α-cetoglutaramic:



În tractul intestinal, flora bacteriană produce cantități însemnate de amoniac, transportate prin circulația sângelui. Totuşi, în circulația sângelui persistă cantități foarte mici de amoniac, deoarece formarea acestui compus toxic pentru celulele cerebrale este compensată de procesul glutaminogenezei din țesuturile periferice şi de cel al ureogenezei din ficat.

În plasmă, la pH=7,4, conținutul în ioni de amoniu este predominant (98%), în timp ce amoniacul liber este prezent în proporție de maxim 2%.

În afară de rolul important şi esențial pe care îl joacă în metabolism, ca elemente constitutive ale proteinelor, aminoacizii pot participa şi la biosinteza unor compuşi biologic activi ca: vitamine, hormoni, nucleotide etc. Unii aminoacizi îndeplinesc ei înşişi funcții de hormoni (tiroxina şi triiodtironina – ca hormoni tiroidieni).

Acidul para-aminobenzoic (PAB), denumit şi vitamina H_1, este factor de creştere pentru bacterii, fungi, drojdii, virusuri.

Acidul γ-aminobenzoic (GABA) joacă rol de mediator chimic în transmiterea impulsurilor nervoase.

β-Alanina intră în structura acidului pantotenic (el însuşi o vitamină), a coenzimei A, a carnozinei şi a anserinei.

Acizii aspartic şi glutamic se găsesc liberi în citoplasmă şi stabilesc corelații metabolice între glucide şi proteine; acidul glutamic este implicat şi în procesul de detoxifiere a amoniacului la mamifere.

Metionina joacă rol de donor de grupe metil în reacțiile de transmetilare, iar glicocolul este precursor în sinteza hemului.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

III. PEPTIDE

Peptidele sunt substanțe naturale sau de sinteză, care conțin în moleculă un număr relativ mic de resturi de aminoacizi, unite între ele prin legături peptidice.

O formulă structurală care să corespundă majorității termenilor din clasa peptidelor poate fi următoarea:

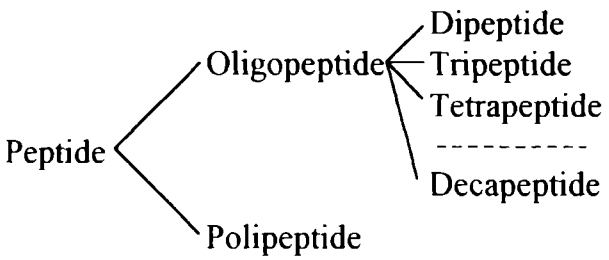
Pentru $2 \leq n \leq 10$, compușii se numesc oligopeptide. Această formulare are un caracter mai general, putându-se extinde la polipeptide (pentru $10 < n < 100$) și la proteine (pentru $n \geq 100$).

Între resturile de aminoacizi se stabilesc legături peptidice, de-a lungul întregii catene. Legătura peptidică se formează prin eliminarea unei molecule de apă dintr-o grupă carboxilică a unui aminoacid și grupa aminică a unui alt aminoacid.

În materia vie există un număr mare de peptide, fiecare dintre ele îndeplinind anumite funcții biologice.

III.1. Clasificare

Peptidele se clasifică după numărul resturilor de aminoacizi și, implicit, după masele moleculare:



După numărul resturilor de aminoacizi din moleculă, oligopeptidele se împart în dipeptide (două resturi), tripeptide (trei resturi) etc. După masele moleculare, polipeptidele ajung până la 10 KDa, iar peste această valoare se trece în domeniul proteinelor.

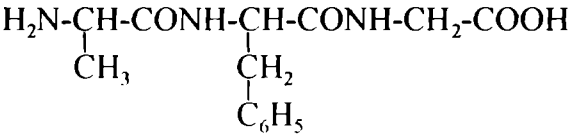
Privite în ansamblu, se observă că peptidele se situează între aminoacizi și proteine.

III.2. Nomenclatură

Denumirea peptidelor se formează din denumirile resturilor de aminoacizi constituenți, luați în ordine succesivă, începând de la capătul N-terminal (așezat prin convenție în partea stângă) și adăugând în final, denumirea integrală a aminoacidului C-terminal.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Exemplu:



Alanil-fenilalanil-glicină

Pentru uşurința şi claritatea reprezentării denumirii unei peptide se utilizează simbolurile de trei litere, în locul denumirii întregi, a resturilor de aminoacizi. Sub acest raport, tripeptida de mai sus apare sub denumirea prescurtată astfel:

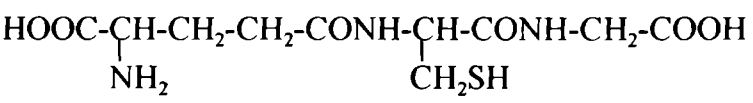
Ala-Phe-Gly.

Datele sunt corecte pentru peptidele preparate din α-L-aminoacizi, în care pentru formarea grupelor peptidice participă grupele α-amino- şi α-carboxil.

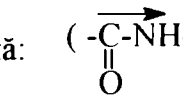
Atunci când într-un derivat peptidic, grupele peptidice au luat naştere prin interacțiunea altor grupe decât cele din α, sau dacă intervin în structură aminoacizi aparținând familiei (seriei) sterice D sau racemici (DL), particularitățile se includ în denumire. În plus, pentru aminoacizii naturali din familia sterică L, precizarea în formula structurală a seriei se poate omite.

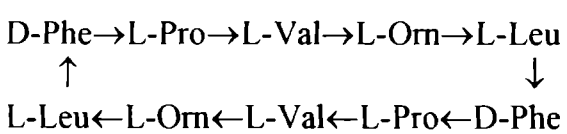
Compuşii peptidici în care, la formarea grupelor peptidice nu participă grupele α-carboxil şi α-amino-, se numesc peptide atipice.

Exemplu:



γ-Glutamil-cisteinil-glicină
(Glutation)

Aceste particularități se mențin şi pentru peptidele ciclice, numai că, în formula scrisă, trebuie precizat şi sensul grupei peptidice, reprezentat prin săgeată:  , ca în cazul gramicidinei S.



Gramicidina S

Când în structura unei peptide există un segment a cărui secvență nu se cunoaşte, deşi aminoacizii care o compun sunt identificați, aceştia vor fi prezentați cumulat, în paranteză.

Exemplu:

Ala-Gly-Pro-Cys-(Asp, Phe, Tyr, Trp)-Phe-Me
1 2 3 4 (5 - 8) 9 10

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

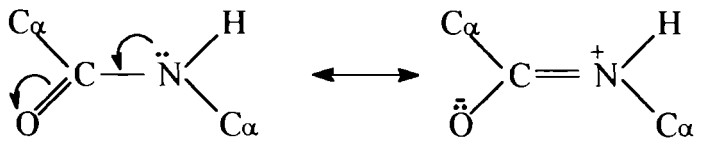
Pe lângă denumirile raționale, științifice, pentru peptide se utilizează mult mai frecvent denumirile uzuale (neștiințifice), deoarece acestea oferă o mai bună operativitate în prezentarea scrisă sau vorbită.

Exemple: glutation, carnozină, bradikinină, insulină etc.

III.3. Structura peptidelor

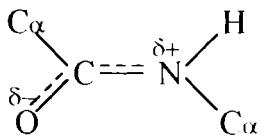
Molecula unei peptide cuprinde un număr relativ restrâns de resturi de aminoacizi, unite prin legături peptidice. Un loc important în cunoașterea structurii peptidelor îl ocupă structura grupei peptidice și structura primară.

Grupa peptidică, fiind o grupă amidică substituită la azot, admite fenomenul de rezonanță.



(a) (b)

Formulele a și b, luate separat, nu corespund structurii reale a grupei peptidice. Structura reală posibilă va fi intermediară celor două structuri limită, cu o distribuție globală a sarcinilor electrice:



Aranjament transoid

Prezența acestei legături duble, chiar parțiale, conferă posibilitatea apariției izomerilor sin-anti. Izomerul anti fiind mai stabil, va fi preferat în structura peptidelor și proteinelor naturale.

Prin metoda difracției razelor X a fost posibilă măsurarea distanțelor interatomice și evaluarea unghiurilor dintre legăturile grupei peptidice.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

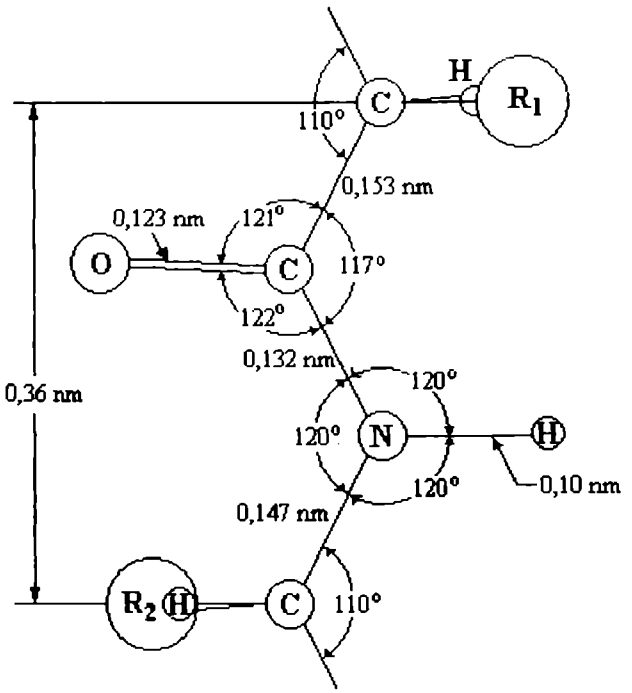


Fig.III.1 – Distanțele interatomice şi unghiurile dintre legături în grupa peptidică

Prin cercetări s-a găsit că legătura C=N are cca 40% caracter de legătură dublă, iar legătura C=O, aproximativ 40% caracter de legătură simplă.

Existența legăturii parțial duble C=N imprimă grupei peptidice o structură plană, ceea ce obligă dispunerea celor 6 atomi care o formează ($2C_\alpha$, C, N, O, H), într-un singur plan.

Caracterul de dublă legătură parțială dintre atomii C=N şi planul relativ rigid în care aceştia se află, nu permit o rotație liberă normală. Rotația este frânată în jurul acestei legături.

În schimb, rotația relativ liberă este permisă atomilor C_α în jurul legăturilor simple C_α-C şi C_α-N. Dar nici aici nu poate fi vorba de o rotație total liberă. Intervin împiedicări sterice datorate radicalilor R ai carbonului C_α (în funcție de volumul lor) de la intersecția planelor. Unghiurile Φ şi Ψ vor avea valori variabile, încadrându-se numai în limitele permise de aceste condiții (fig.III.2).

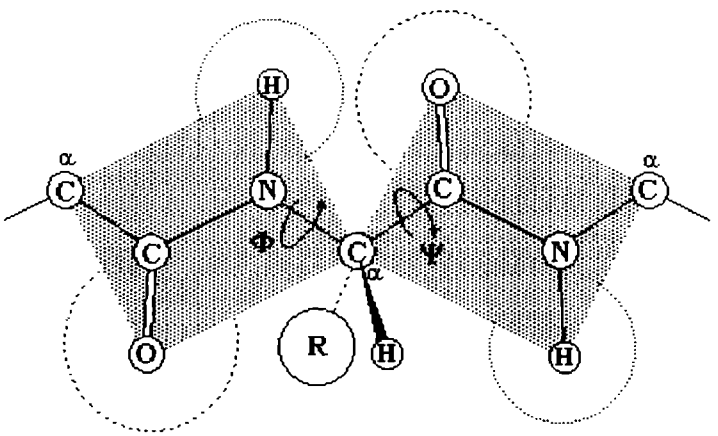


Fig.III.2 – Posibilitățile de rotire în jurul unor legături simple C_α-C şi C_α-N, din catenele peptidice

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Planeitatea grupei peptidice şi rotirea liberă a atomilor C_α în jurul acestor legături reprezintă elemente structurale importante pentru realizarea structurii conformaționale a multor polipeptide şi, mai cu seamă, proteine.

III.3.1. Structura primară (structura covalentă)

Caracteristică peptidelor este structura primară, înțelegând prin aceasta noțiunea care cuprinde natura resturilor de aminoacizi, numărul lor, raporturile cantitative dintre ele şi succesiunea (secvența) pe care o ocupă fiecare în moleculă.

Variația parametrilor structurii primare generează un număr considerabil de termeni peptidici, după cum se poate constata din posibilitatea existenței în forme izomere, chiar a unei tripeptide:

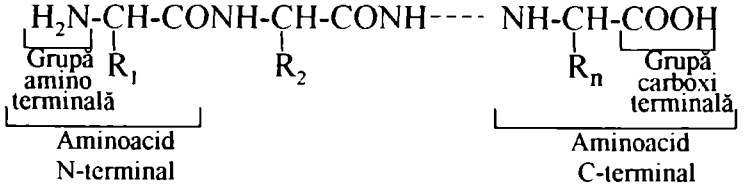
Ala-Gly-Phe	Gly-Ala-Phe	Phe-Ala-Gly
Ala-Phe-Gly	Gly-Phe-Ala	Phe-Gly-Ala

Pentru cazul simplu, când în structură intră un număr "n" de aminoacizi diferiți, o singură dată pentru fiecare izomer peptidic, numărul N al acestor izomeri poate fi calculat cu uşurință, prin relația: $N = n!$. Se poate verifica astfel şi matematic, numărul de 6 tripeptide izomere rezultate din cei trei aminoacizi din exemplul de mai sus ($3!=6$). Din cinci aminoacizi vor rezulta 120 pentapeptide, din 7 aminoacizi – 5040 heptapeptide izomere etc. Când aminoacizii intră în structura peptidică de mai multe ori, situația se complică, iar regularitatea dispare.

Având în vedere că numai o heptapeptidă permite 5040 izomeri, o polipeptidă sau proteină va ajunge la cifre impresionante de forme izomere, din cel mult 20 de aminoacizi naturali existenți în proteine. Se poate înțelege prin aceasta marea diversitate structurală şi funcțională a proteinelor.

Pentru marea majoritate a peptidelor, în special cele derivate din proteine, în legăturile peptidice sunt angajate grupele α-carboxi şi α-amino apaținând aminoacizilor constituenți, cu excepția unei grupe α-amino şi a uneia α-carboxi, situate la extremitățile lanțului peptidic.

Grupa $-NH_2$ liberă, reprezentată prin convenție în partea stângă a catenei, se numeşte grupă amino terminală, iar grupa –COOH liberă, situată la cealaltă extermitate a catenei (în dreapta), se numeşte grupa carboxi terminală. Resturile aminoacizilor de la cele două extremități ale catenei peptidice, pe care sunt grefate aceste grupe, primesc denumirile de aminoacid N-terminal sau N-acid şi respectiv, aminoacid C-terminal sau C-acid.



Radicalii R_1, R_2,.... etc. sunt diferiți şi formează catene scurte. Caracteristicile moleculare ale peptidelor (sarcina electrică, proprietățile fizice, chimice, legăturile inter- şi intra catenare etc.) depind de natura aminoacizilor pe care îi conțin.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

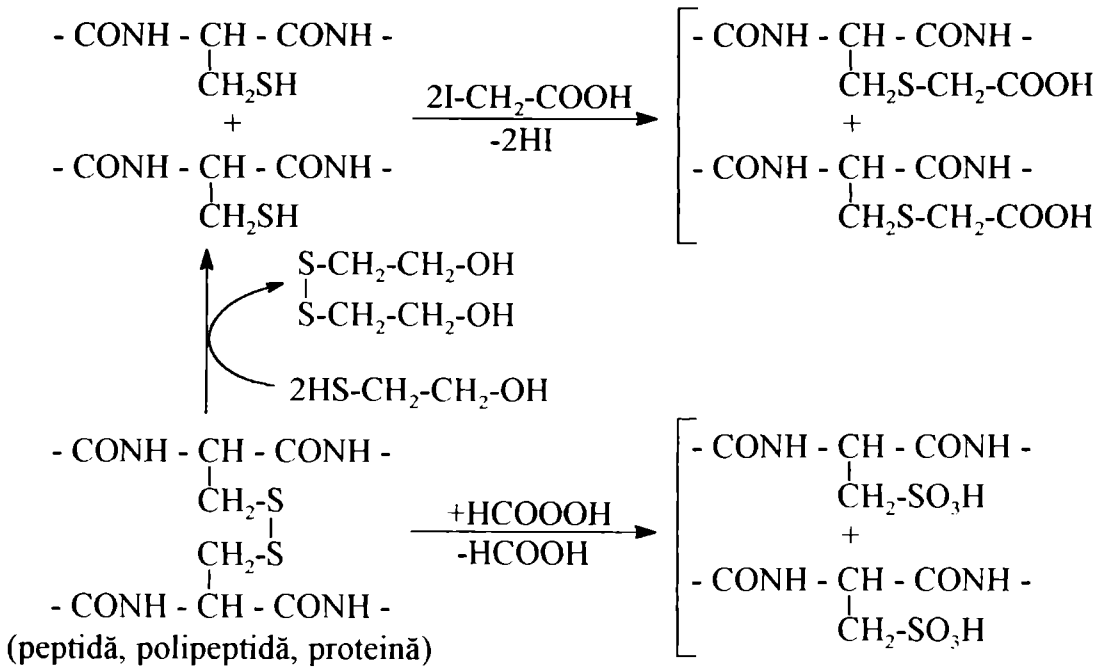
III.3.1.1. Determinarea structurii primare

Stabilitatea structurii primare a peptidelor (polipeptidelor şi proteinelor) îmbracă aspecte mai mult sau mai puţin laborioase, în funcţie de complexitatea lor moleculară. Problema este comună peptidelor, polipeptidelor şi proteinelor şi se referă la structura lor monocatenară individuală.

Trebuie văzut mai întâi dacă în structura globală a lor există una sau mai multe catene peptidice (polipeptidice sau proteice) asociate. Situaţia se clarifică prin determinarea numărului de aminoacizi N-terminali sau C-terminali per moleculă. Spre exemplu, dacă o polipeptidă (sau proteină) precum insulina, dă la analiză două molecule de aminoacizi în poziţii N-terminale pentru fiecare mol de compus, se înţelege clar că insulina are o moleculă bicatenară.

Se efectuează apoi dezagregarea edificiului multicatenar, prin metode adecvate, separarea şi purificarea fiecărei catene în parte şi apoi determinarea structurii primare.

Pentru cazul în care catenele sunt unite între ele prin legături disulfurice, covalente, desfacerea lor se efectuează prin reducere cu mercaptoetanol sau prin oxidare cu peracizi (acid performic). În primul caz, grupele sulfhidrilice rezultate se protejează prin carboximetilare, cu acid iodacetic.



Din amestecul de reacţie peptidele monocatenare se separă cromatografic sau electroforetic şi se purifică.

În continuare, o metodologie comună trebuie să cuprindă,în general, anumite etape:

-identificarea şi dozarea aminoacizilor din structura peptidelor;

-identificarea aminoacizilor N- şi C-terminali;

-determinarea secvenţei aminoacizilor din lanţul peptidic. Aceasta este o problemă care, la rândul ei, necesită mai multe etape:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

-scindarea specifică a fiecărei catene în fragmente peptidice mai mici;

-determinarea secvenței aminoacizilor în aceste fragmente peptidice;

-determinarea modului de asamblare a acestora, pentru a obține secvența finală.

III.3.1.1.1. Identificarea şi dozarea aminoacizilor constituenți

Peptida (polipeptida sau proteina) monocatenară, unitară, pură se supune unei hidrolize totale, prin fierbere cu acid clorhidric 6N, la 100-120°C, în tub închis, timp de 10-24 ore. În timpul hidrolizei acide, triptofanul se descompune în întregime, serina şi treonina sunt descompuse parțial, iar asparagina şi glutamina sunt hidrolizate la acizii aspartic şi glutamic.

Hidroliza se poate efectua şi în mediu bazic, unde triptofanul nu se descompune, numai că, atât acesta cât şi ceilalți aminoacizi optic activi se racemizează, iar cisteina, serina şi treonina se descompun.

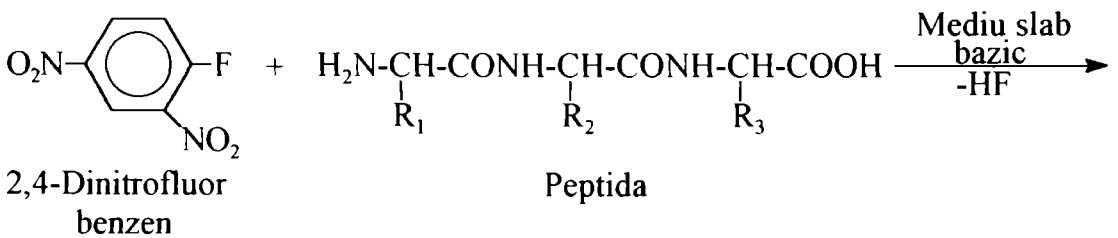
Determinările calitative şi cantitative ale aminoacizilor din hidrolizatul în mediu acid se efectuează pe baza datelor cromatografice sau electroforetice. Triptofanul se determină din hidrolizatul în mediu bazic, care conține D,L-triptofan, prin metode microbilogice sau alte metode. Determinările actuale, mai moderne, se fac cu ajutorul analizoarelor automate de aminoacizi, aparate de înaltă performanță, care permit obținerea unor rezultate calitative şi cantitative deosebite.

III.3.1.1.2. Determinarea aminoacidului N-terminal

Pentru determinarea structurii unei peptide (sau proteine), un loc important îl ocupă identificarea aminoacizilor de la extremitățile lanțului, respectiv, a aminoacizilor N- şi C-terminali, dar şi a aminoacizilor cuprinşi secvențial între aceştia.

Determinarea aminoacidului N-terminal se poate face prin mai multe metode, dintre care vor fi descrise cele mai importante.

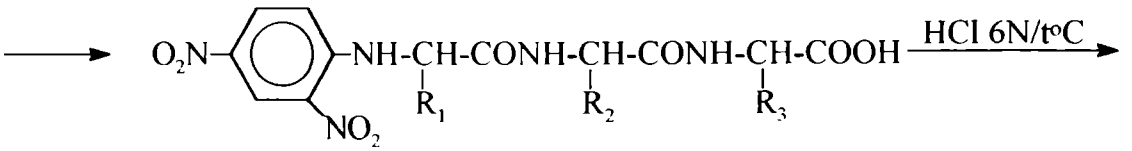
A.Metoda Sanger. Prima metodă folosită la determinarea aminoacidului N-terminal a fost descrisă de Sanger (1949), care arată că grupa α-amino liberă, neprotonată, aparținând unei peptide (aminoacid sau proteine), reacționează cu 2,4-dinitrofluorbenzenul, conducând la 2,4-dinitrofenilpeptida corespunzătoare, de culoare galbenă:



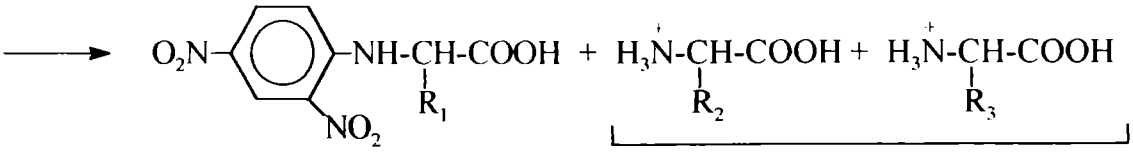
2,4-Dinitrofluor benzen

Peptida

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



2,4-Dinitrofenilpeptida



2,4-Dinitrofenilderivatul N-acidului

Amestec de aminoacizi liberi

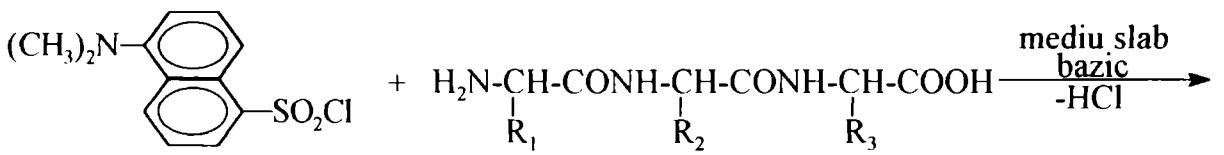
Prin hidroliză cu HCl 6N la cald, toate legăturile peptidice din 2,4-dinitrofenilpeptidă se desfac, în hidrolizat aflându-se aminoacizii componenți și 2,4-dinitrofenilderivatul aminoacidului N-terminal (galben).

Identificarea acestui ultim compus și prin intermediul său, identificarea aminoacidului N-terminal din catena peptidică (sau proteică), se face prin analiză cromatografică, utilizând ca probe standard (probe martor) 2,4-dinitrofenilderivați cunoscuți ai diferiților aminoacizi.

De remarcat că metoda Sanger se poate aplica pe aceeași probă numai o singură dată, având în vedere că derivatul peptidic este dezmembrat în cursul hidrolizei acide, când sunt scindate toate legăturile peptidice.

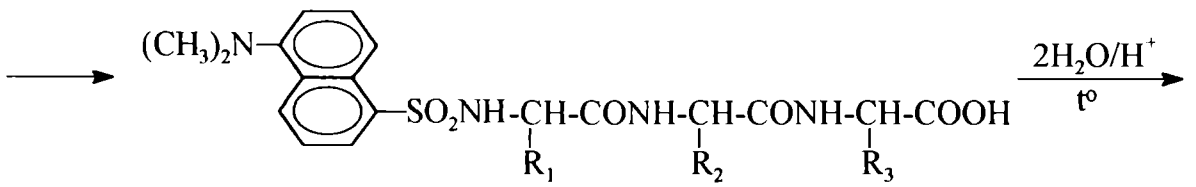
B.Identificarea aminoacidului N-terminal cu clorură de dansil (Hartley). Succesul deosebit obținut de Sanger prin utilizarea 2,4-dinitrofluorbenzenului, reactiv care-i poartă numele, a stârnit un interes deosebit pentru găsirea unor reactivi mai sensibili, pe care să se sprijine alte metode mai eficiente de identificare a N-acidului unei peptide.

Un astfel de reactiv s-a dovedit a fi clorura de dansil (nume abreviat al clorurii de 1-dimetilaminonaftalin-5-sulfonil), care reacționează cu grupa amino liberă, neprotonată, a unui aminoacid, peptide sau proteine, formând dansilderivații corespunzători, puternic fluorescenți:



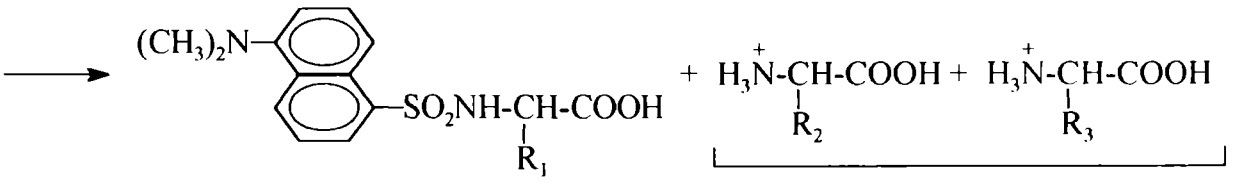
Clorură de dansil

Peptidă



Dansilpeptidă

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Dansilaminoacid Amestec de aminoacizi liberi

Prin hidroliza în mediu acid a peptidei dansilate care s-a format în prima reacție, se obține în hidrolizat dansilderivatul N-acidului în amestec cu ceilalți aminoacizi componenți din structura peptidei.

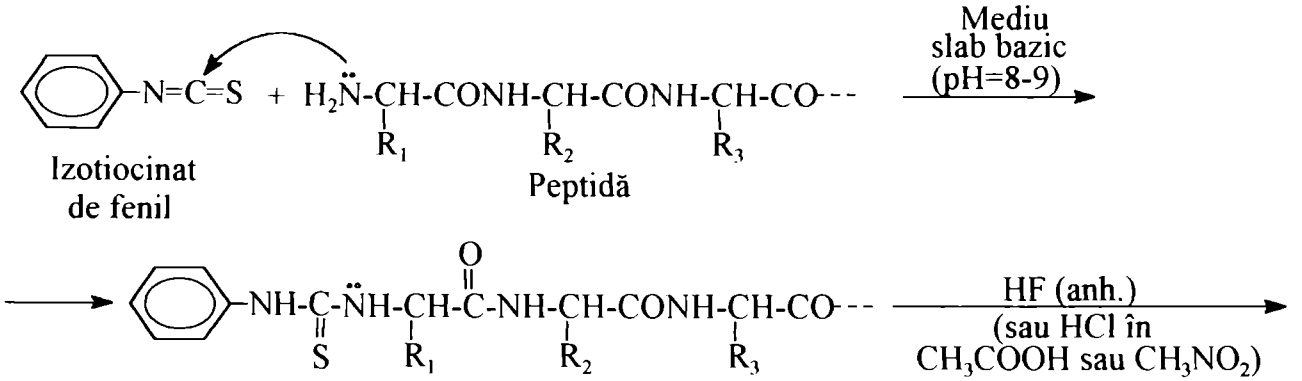
Se constată că la hidroliza acidă a dansilpeptidei sunt scindate toate legăturile peptidice, în timp ce grupa sulfonamidică a dansilaminoacidului rămâne nealterată.

Dansilaminoacidul, fiind un compus puternic fluorescent, poate fi identificat şi dozat prin metode fluorimetrice, metode mai sensibile de cca 100 ori decât cele colorimetrice. Sensibilitatea metodei este aşa de ridicată, încât din hidrolizatul peptidei dansilate se poate identifica dansilderivatul N-acidului, chiar în cantități de ordinul nanogramelor.

Trebuie observat că şi metoda dansilării se poate aplica pe aceeşi probă de peptidă numai o singură dată, pentru că şi în acest caz, restul peptidei se dezmembrează din cauza ruperii legăturilor peptidice, de tip carboxamidic.

C.Metoda Edman. Determinarea aminoacidului N-terminal dintr-o peptidă sau proteină prin metoda Edman, presupune reacția izotiocianatului de fenil (numit şi fenilsenevol), cu grupa amino terminală liberă, neprotonată, a acestor compuşi, în mediu slab bazic. Feniltiocarbamoilpeptida formată se tratează cu acid fluorhidric anhidru, care clivează prima grupă peptidică din secvență, formată din grupa α-carboxilică a feniltiocarbamoil derivatului N-acidului şi grupa α-amino a aminoacidului următor.

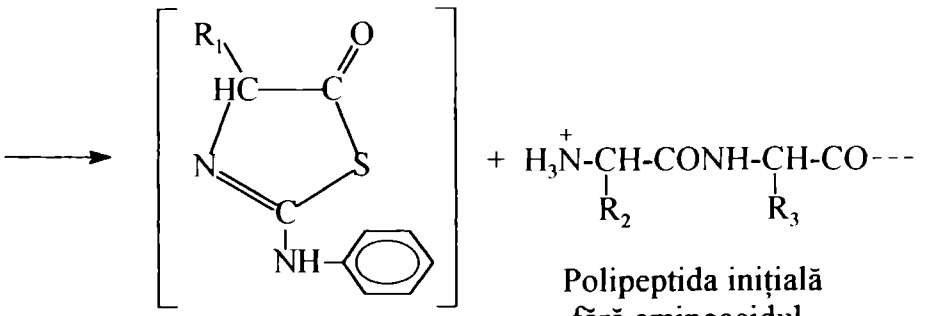
Din reacție rezultă tiazolinonderivatul N-acidului şi o peptidă mai scurtă cu un aminoacid decât peptida inițială:



Izotiocinat de fenil Peptidă

Feniltiocarbamoilpeptidă

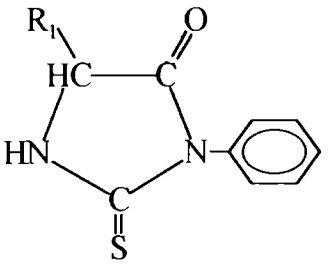
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Tiazolinon derivatul N-acidului

Polipeptida inițială fără aminoacidul N-terminal

H^+ transpoziție



Feniltiohidantoin-derivatul N-acidului

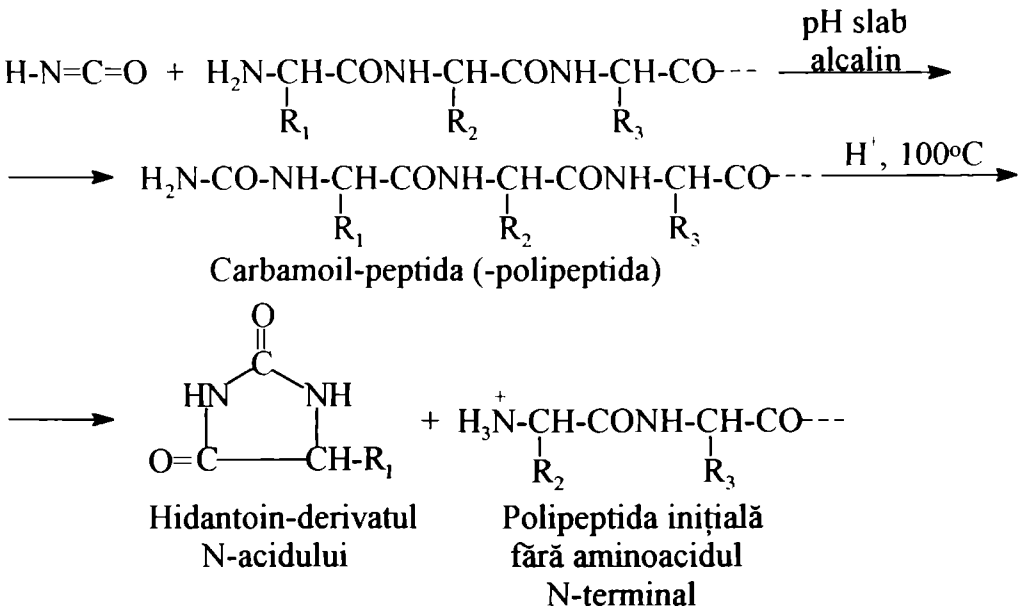
Prin urmare, în cursul reacției Edman este îndepărtat aminoacidul N-terminal, însă restul catenei peptidice rămâne intact. Tiazolinon derivatul N-acidului se extrage selectiv cu un solvent organic şi se transformă în feniltiohidantoin derivat, mai stabil, prin tratare cu o soluție apoasă acidă. Acest ultim derivat poate fi identificat prin mai multe metode, ca: CSS, electroforeză, HPLC sau GLC eventual, combinate cu spectroscopia de masă.

Asupra peptidei mai scurte care are ca N-acid al doilea aminoacid din secvența peptidei inițiale, se repetă aceleaşi operații ca în cazul primului aminoacid, identificându-l ca feniltiohidantoin derivat. Aceleaşi operații se repetă mai departe, pas cu pas, pentru fiecare aminoacid, putându-se determina secvența completă a peptidei sau polipeptidei luată în studiu.

Pentru simplitatea şi avantajele practice pe care le are, metoda Edman a fost perfecționată şi, pe principiul ei, s-au construit secvențiatoare automate, computerizate, aparate de înaltă performanță, care permit nu numai determinarea N-acidului unei peptide, ci chiar întreaga ei secvență de aminoacizi.

D.Metoda cu cianat. Aceasta poate fi considerată o variantă simplificată a metodei Edman, în care peptida sau proteina este tratată cu acid cianic în mediu slab alcalin. Intermediar se formează carbamoilpeptida, care prin încălzire în prezența ionilor H^+ conduce la desprinderea aminoacidului N-terminal sub formă de hidantoină substituită:

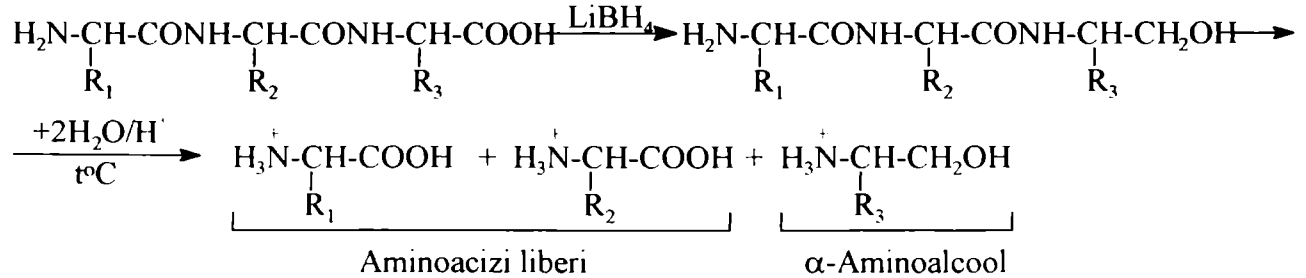
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



La fel ca şi în cazul metodei Edman, scindarea cu acid cianic poate continua, determinându-se secvența peptidei (polipeptidei) luată în lucru.

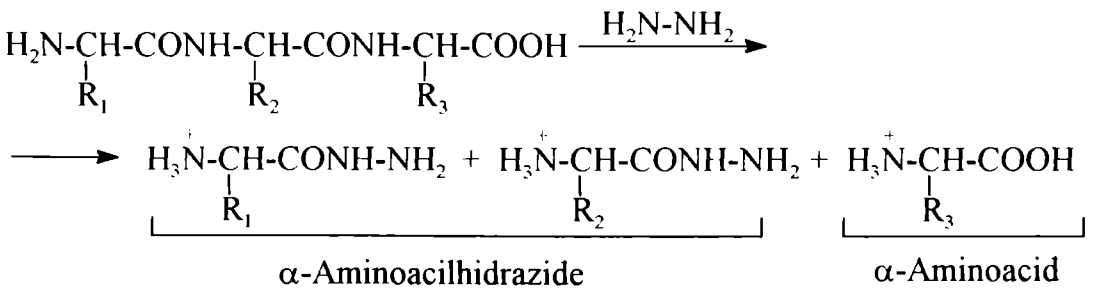
III.3.1.1.3. Determinarea aminoacidului C-terminal

A.Reducerea cu borohidrură de litiu. Borohidrura de litiu reduce grupa carboxilică C-terminală din peptide (sau proteine), transformând-o în alcool primar, fără a afecta grupele peptidice. Peptida astfel redusă dă, prin hidroliza completă, un amestec de reacție în care sunt prezenți toți aminoacizii constituenți, cu excepția C-acidului, care va fi găsit prin metode cromatografice sub formă de α-aminoalcool.



B.Metoda Akabori (hidrazinoliza peptidelor). Hidrazina anhidră atacă toate legăturile peptidice dintr-un lanț peptidic (sau proteic) şi nu reacționează cu grupa carboxilică terminală.

Exemplu:

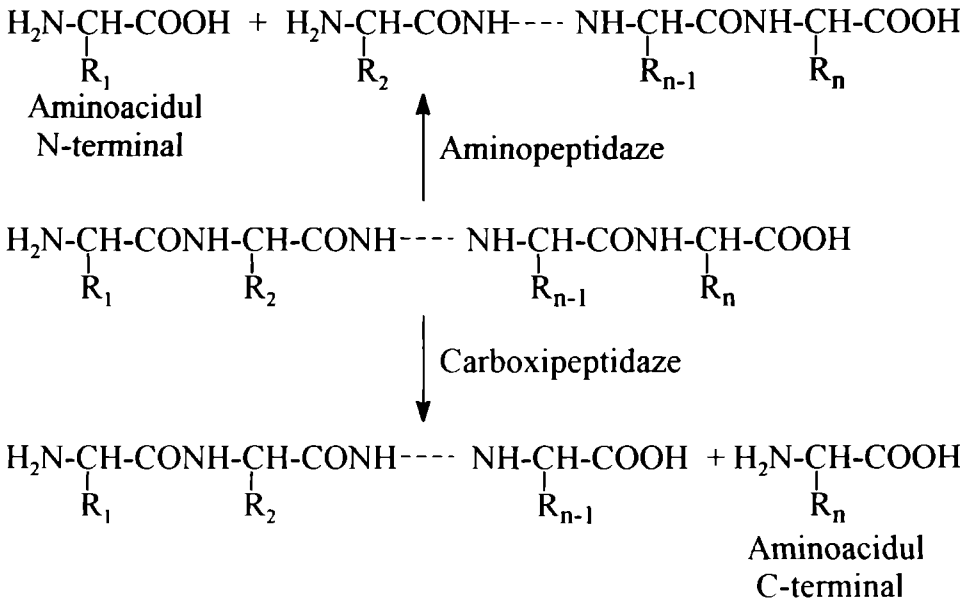


https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Reacția are loc la 90°C timp de 20-100 ore, în prezența unei rășini schimbătoare de ioni slab acidă, drept catalizator. În timpul reacției, toate resturile aminoacizilor din peptidă (sau proteină) sunt transformate în aminoacilhidrazide, excepție făcând aminoacidul C-terminal, care rămâne în stare liberă și se identifică cromatografic.

III.3.1.1.4. Metode enzimatice

Determinarea resturilor aminoacizilor N-terminali sau C-terminali din peptide și proteine se poate face și enzimatic, cu enzime specifice. Din acest punct de vedere, se disting aminopeptidazele, care catalizează hidroliza legăturilor peptidice la care participă aminoacidul N-terminal cu grupa carboxilică și respectiv, carboxipeptidazele, care hidrolizează legătura peptidică la care participă aminoacidul C-terminal, prin grupa sa aminică din poziția α:



Dintre aminopeptidaze fac parte aminopeptidaza A, aminopeptidaza B și leucin-aminopeptidaza, toate încadrându-se în categoria exopeptidazelor și având specificități diferite.

Leucinaminopeptidaza din rinichiul de porc are o stereospecificitate strictă la seria L, dar o slabă specificitate în serie. Hidrolizează în majoritate L-peptidele, eliberând aminoacidul N-terminal, cu excepția prolinei, cu condiția ca grupa amino terminală să fie liberă.

Aminopeptidaza A hidrolizează legăturile peptidice pe care le formează acizii monoaminodicarboxilici, în calitate de aminoacizi N-terminali. Aminopeptidaza B detașează aminoacizii bazici (arginina și lisina) de la capătul N-terminal, când grupele δ-, respectiv ε-amino sunt libere.

Detașarea aminoacidului C-terminal din peptide (sau proteine) se produce sub acțiunea carboxipeptidazelor A, B și C, la rândul lor, exopeptidaze.

Carboxipeptidaza A din pancreasul de bovină, detașează hidrolitic toți aminoacizii C-terminali, cu excepția argininei, lisinei, prolinei, a resturilor C-terminale care conțin grupe –SH și $-SO_3H$ libere dar și pe cei precedați de prolină.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Carboxipeptidaza B din pancreasul de bovină, acționează preferențial asupra legăturilor pepetidice care implică arginina sau lisina, ca aminoacizi C-terminali.

Carboxipeptidaza C din citrice, are o foarte mică specificitate de substrat, hidrolizând fără excepție toate legăturile formate din aminoacizii C-terminali liberi (mai greu glicina).

Pentru identificarea aminoacizilor N-terminali şi C-terminali pot fi utilizate aminopeptidazele A, B şi carboxipeptidazele A, B, iar când se urmăreşte întreaga secvență a peptidei se lucrează cu leucinaminopeptidază sau carboxipeptidaza C, enzime cu o slabă specificitate de substrat. Aceasta se datorează faptului că după îndepărtarea hidrolitică a aminoacidului terminal (după caz, N- sau C-terminal), acțiunea acestor enzime nu poate fi oprită trecând de fiecare dată la următorul aminoacid din secvență.

Identificarea aminoacizilor eliberați secvențial se face prin măsurarea vitezei de detaşare a lor, în mediul de reacție. Efectuând măsurători consecutive asupra eliberării prin hidroliză a diverşilor aminoacizi rămaşi în poziție terminală, ca urmare a îndepărtării aminoacidului precedent, se poate deduce întreaga secvență a peptidei cercetate. Rezultatele leucin-aminopeptidazei fiind mai bune, în practică se preferă utilizarea ei.

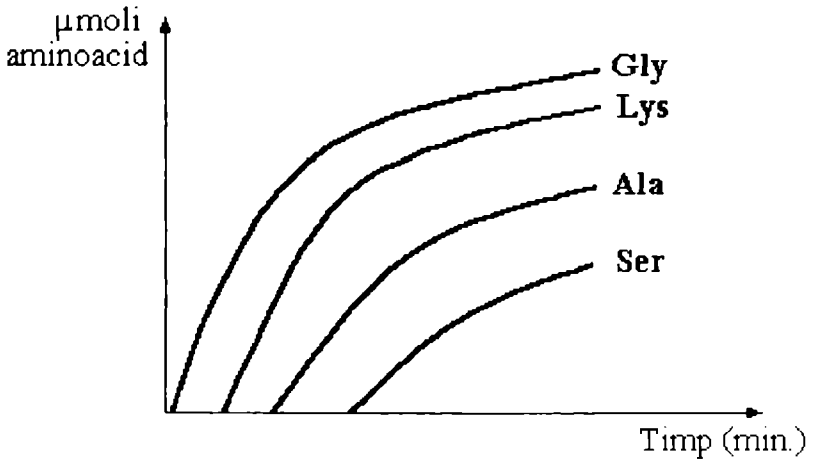


Fig.III.3 – Determinarea secvenței cu leucinaminopeptidază

Pentru ca reacția cu leucinaminopeptidază să aibă loc, grupa α-amino a N-acidului trebuie să fie liberă. Reacția decurge detaşând aminoacid cu aminoacid, secvențial, astfel încât după eliberarea N-acidului, enzima scindează pe al doilea, apoi pe al treilea aminoacid ş.a.m.d, aceştia devenind pe rând N-acizii peptidelor mai scurte care se formează. Aminoaczii eliberați în mediul de reacție se separă prin dializă, la anumite intervale de timp şi se analizează. Spre exemplu, dacă se acționează asupra unei peptide şi se obțin datele din figura III.3, având în vedere că ordinea apariției aminoacizilor în hidrolizat este indicativul de bază în determinarea secvenței peptidei (sau proteinei), aceasta va fi:

Gly-Lys-Ala-Ser

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

La astfel de rezultate se ajunge în mod normal. Poate apărea însă un inconvenient important în aplicarea acestei metode. Enzimele respective acționează cu viteze diferite de scindare a legăturilor peptidice, determinate de natura diferită a aminoacizilor care le formează, producând dificultăți în modul de evaluare a rezultatelor.

Astfel, dacă într-o peptidă de forma a_1-a_2-a_3-a_4 viteza de clivare a N-acidului a_1 este mai mică decât a aminoacidului a_2 şi a acestuia mai mică decât cea necesară pentru clivarea aminoacidului a_3, se ajunge repede la un amestec de aminoacizi, unde alături de primul aminoacid a_1 apar şi aminoacizii a_2 şi a_3, în concentrații asemănătoare sau chiar mai mari, împiedicând practic, determinarea corectă a secvenței de aminoacizi din peptidă.

În scopul determinărilor structurale se preferă mai frecvent leucinaminopeptidaza.

Determinarea secvenței unui lanț macromolecular al unei peptide sau proteine, după depistarea aminoacizilor N- şi C-terminali, se poate face într-un mod eficient prin scindarea acestui lanț în paralel, cu două enzime specifice (de exemplu, tripsină şi chimotripsină) sau cu o enzimă şi un reactiv chimic specific (de exemplu, tripsină şi bromcian). După separarea pe o coloană de schimbători de ioni a peptidelor mai mici din amestecul de reacție al fiecărei enzime şi determinarea secvenței lor de aminoacizi, se obțin două seturi de peptide cu structuri determinate.

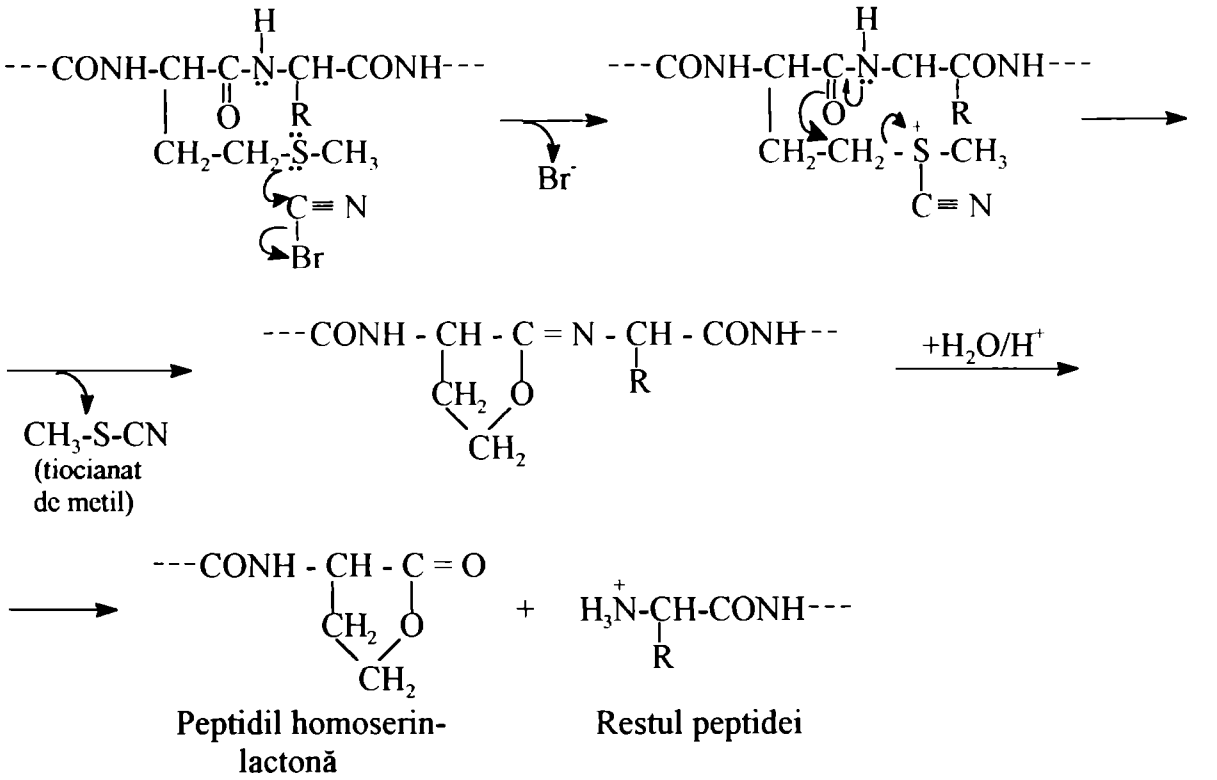
Cunoscându-se aminoacizii N- şi C-terminali ai peptidei inițiale, tipul legăturilor peptidice atacate hidrolitic de tripsină şi chimotripsină, se pot cunoaşte, implicit, aminoacizii C-terminali ai lor. În acest sens, se ştie că tripsina acționează specific asupra legăturilor peptidice pe care le formează arginina sau lisina prin grupa carboxilică şi că aceşti doi aminoacizi vor deveni aminoaczi C-terminali ai peptidelor din set (cu excepția peptidei care conține C-acidul catenei inițiale).

Chimotripsina scindează preferențial legăturile peptidice pe care le formează aminoacizii cu caracter aromatic, prin grupa lor carboxilică şi grupa aminică a altui aminoacid, cu radicalul R nepolar.

Prin aranjarea peptidelor din cele două seturi paralele astfel ca prin suprapunerea lor să rezulte una şi aceeaşi secvență de aminoacizi, se află secvența peptidei sau proteinei inițiale.

În mod asemănător se procedează şi în cazul utilizării bromcianului. Acest reactiv scindează preferențial legăturile peptidice pe care le formează metionina prin grupa sa carboxilică, cu grupa α-amino a unui alt aminoacid, metionina rămânând C-acidul peptidei care o conține:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Peptidil homoserin-lactonă

Restul peptidei

Coroborând rezultatele obținute cu o protează (de exemplu, tripsină), se poate deduce secvența peptidei cercetate.

Concret, acționând separat, cu bromcian şi tripsină (sau o altă endopeptidază specifică) asupra unei peptide şi aranjând fragmentele mai mici din seturi pe baze raționale, ca mai jos, avem imaginea de suprapunere:

a)Peptide de la scindarea cu tripsină { Tyr-Lys ; Glu-Met-Leu-Gly-Arg ; Ala-Gly

b)Peptide de la scindarea cu bromcian { Tyr-Lys-Glu-Met ; Leu-Gly-Arg-Ala-Gly

---

Secvența determinată va fi: { Tyr-Lys-Glu-Met-Leu-Gly-Arg-Ala-Gly

Dacă este necesar, pentru o mai bună determinare, se introduce în context încă un set de peptide, cu lanțuri mai mici, rezultat prin hidroliza parțială, selectivă a aceleiaşi peptide (sau proteine) cu încă o endopeptidază specifică, cum este chimotripsina.

Metodologia experimentală descrisă mai sus a contribuit într-un mod spectaculos la descifrarea structurii unor substanțe de natură peptidică şi proteică complicate.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Primul succes în această direcție l-a constituit stabilirea structurii complete a insulinei de către Sanger în 1956. Calea fiind deschisă, a urmat elucidarea structurii şi a altor substanțe deosebite, ca: ribonucleaza, hemoglobina, mioglobina, papaina, tripsinogenul, citocromul c etc.

Actualmente se determină secvența aminoacizilor dintr-o peptidă sau proteină cu secvențiatoare automate, care îmbină în mod fericit metoda Edman, pentru determinarea secvențială a aminoacizilor cu HPLC. Rezultatele sunt foarte bune şi incomparabil mai rapide decât metodele clasice discutate.

III.4. Proprietăți generale

Fiind formate din resturi de aminoacizi şi localizate după masele moleculare şi gradul de complexitate structurală între aminoacizi şi proteine, peptidele vor prezenta unele proprietăți asemănătoare acestora.

Peptidele sunt substanțe solide, cristaline, de culoare albă, în general solubile în apă, insolubile în solvenți organici şi nu coagulează la încălzire. Au puncte de topire ridicate, frecvent cu descompunere. Cu apa oligopeptidele formează soluții moleculare, iar polipeptidele formează soluții micelare, asemănător cu proteinele. Solubilitatea şi tendința de cristalizare scad cu creşterea masei moleculare.

O serie de proprietăți, care au fost menționate deja sau vor interveni în contextul altor subiecte, vor fi prezentate la locul potrivit.

III.4.1. Activitatea optică

Peptidele pot avea în moleculă numai aminoacizi optic activi, numai aminoacizi optic inactivi sau şi unii şi alții. Este de aşteptat ca peptidele formate exclusiv din aminoacizi optic inactivi să nu prezinte activitate optică, iar cele formate din aminoacizi optic activi să fie optic active. Este suficient ca în structura unei peptide să apară cel puțin un singur aminoacid optic activ, ca aceasta să devină optic activă.

$H_2N\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}CONH\text{-}CH_2\text{-}COOH$ (optic inactivă)

β-Alanil-glicina

$H_2N\text{-}\underset{\displaystyle CH_3}{\underset{|}{CH}}\text{-}CONH\text{-}\underset{\displaystyle CH_2\text{-}OH}{\underset{|}{CH}}\text{-}COOH$ (optic activă)

Alanil-serina

$H_2N\text{-}CH_2\text{-}CONH\text{-}\underset{\displaystyle CH_2\text{-}SH}{\underset{|}{CH}}\text{-}COOH$ (optic activă)

Glicil-cisteina

O perturbare în activitatea optică se produce la peptidele rezultate din hidroliza parțială a proteinelor în mediu bazic. Reacția de hidroliză este însoțită de racemizarea resturilor de aminoacizi optic activi. Toate celelalte peptide obținute din proteine prin hidroliză parțială in mediu acid sau enzimatic sunt optic active, prin conținutul lor în L-aminoacizi.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Pentru peptidele relativ scurte, activitatea optică este aproximativ o funcție aditivă a resturilor de aminoacizi optic activi componenți, spre deosebire de polipeptide şi proteine, la care activitatea optică este mai mică decât aditivă, datorită structurii lor mult mai complicate.

III.4.2. Proprietăți acido-bazice (electrochimice)

În soluții neutre peptidele se comportă ca ioni dipolari şi cristalizează într-o rețea ionică. Având grupele aminice şi carboxilice terminale (cu excepția peptidelor ciclice şi a acelora care au aceste grupe blocate), iar multe dintre ele conținând şi radicalii R ai resturilor de aminoacizi cu grupe polare ionizabile, vor manifesta proprietăți electrochimice asemănătoare aminoacizilor. Trebuie reținut că grupele peptidice din lanțul peptidic nu ionizează în domeniul de pH=0-14. Curbele de titrare ale peptidelor, deşi mai complicate, se aseamănă în linii mari cu cele ale aminoacizilor.

Fiecărei peptide îi corespunde un anumit punct izoelectric notat cu pH_i sau P_i, ce se poate calcula ca o medie aritmetică a valorilor pK_1 şi pK_2 din curbele de titrare (vezi proprietățile electrochimice ale aminoacizilor). La punctul izoelectric molecula unei peptide are structură amfionică, solubilitatea cea mai mică şi nu prezintă proprietăți electroforetice. La acest punct solubilitatea este cea mai mică, dar creşte pe măsură ce pH-ul se deplasează într-o parte sau alta față de valoarea lui. La orice valoare de pH, mai mare sau mai mică decât pH_i, molecula peptidelor migrează în câmpul electric, putând fi separate şi analizate prin electroforeză.

Grupele α-aminice şi α-carboxilice terminale fiind la distanțe mult mai mari în comparație cu aceleaşi grupe funcționale din aminoacizi, interacțiile inductive şi electrostatice dintre ele sunt diminuate. Prin urmare, valorile pK pentru grupa carboxi terminală sunt mai mari, iar cele pentru grupa amino terminală sunt mai mici, față de grupele α-carboxi şi α-amino din aminoacizii liberi.

III.4.3. Proprietăți chimice

Proprietățile chimice sunt generate de grupele funcționale prezente în structura peptidelor. Peptidele fiind polimeri cu catenă scurtă ai aminoacizilor, vor avea o serie de reacții comune cu ei. Multe dintre reacțiile chimice precum cele cu 2,4-dinitrofluorbenzenul, clorura de dansil, izotiocianatul de fenil, reacțiile de hidroliză chimică şi enzimatică, reacțiile cu hidrazina, cu borohidrura de litiu, cu bromcianul etc., au fost prezentate deja, la determinarea structurii peptidelor.

O serie de reacții menționate la aminoacizi, respectiv salifierea în mediu acid sau bazic (proprietăți amfotere), reacțiile date cu ninhidrina, cu acidul azotos, reacțiile de reducere a legăturii disulfurice cu β-mercaptoetanol sau oxidarea acesteia cu acid performic (sau alți peracizi) etc., sunt date şi de peptide. Alte reacții, în special reacțiile de culoare şi de precipitare, vor fi descrise în capitolul referitor la proteine. Începând cu tripeptidele, dau reacția biuretului, iar cele cu molecule mai mari, dau şi alte reacții caracteristice proteinelor.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

III.5. Metode de obținere a peptidelor

Peptidele pot fi obținute prin mai multe metode şi anume:

-extracție şi separare din materiale bilogice;

-hidroliză parțială a proteinelor (preferabil enzimatică);

-sinteză chimică;

-biosinteză.

III.5.1. Extracția peptidelor din materiale biologice

Una dintre metodele de extracție a peptidelor are ca etapă premergătoare delipidarea, când țesutul este fin omogenizat în prealabil cu un omogenizator de mare turație, apoi se tratează repetat cu acetonă, la rece (sub 0°C) şi se filtrează la vid. Asupra părții solide de pe filtru se repetă operația de spălare, utilizând de data aceasta eter etilic. Se obține "pudra acetonică", din care se extrag peptidele cu soluții saline diluate sau cu soluții tampon uşor acide sau bazice.

Concentrarea soluțiilor se face la vid, la temperaturi nu prea mari sau prin liofilizare, din soluțiile concentrate putând cristaliza peptidele. Se mai poate efectua precipitarea din soluție, la punctul izoelectric.

Separarea şi purificarea peptidelor se efectuează mai departe, prin cromatografie pe coloană de schimbători de ioni, cromatografie prin excludere moleculară sau utilizând electroforeza.

III.5.2. Obținerea peptidelor prin hidroliza parțială a proteinelor

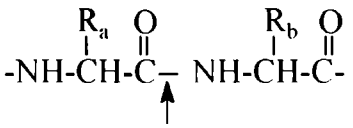
Hidroliza parțială a proteinelor pentru obținerea unor peptide sau polipeptide mai mici se poate efectua prin metode chimice (utilizând reactivi specifici) sau enzimatice, utilizând enzime specifice, care rup selectiv numai anumite legături peptidice din lanțul proteic.

Dintre reactivii chimici specifici, cel mai utilizat este bromcianul (sau bromura de cianogen), care scindează legătura peptidică la care participă metionina prin grupa sa carboxilică (III.3.1.1.4), iar dintre enzime, cele menționate în tabelul III.1, în special tripsina şi chimotripsina.

Pentru separarea peptidelor sau polipeptidelor rezultate se practică precipitarea la punctul izoelectric, metode cromatografice, electroforetice etc.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabelul III.1 – Endopeptidaze specifice



Legătura atacată
de enzimă

Enzima	Sursa biologică în care se află	Specificitatea	Unele precizări
Tripsina	Pancreas de bovină	R_a = rest de Arg, Lys, încărcate pozitiv; $R_b \neq$ Pro	Specificitate înaltă
Chimotripsina	Pancreas de bovină	R_a = resturi hidrofobe voluminoase: Phe, Trp, Tyr; $R_b \neq$ Pro	Scindarea mai slabă pentru: R_a = Asn, His, Met, Leu
Pepsina	Mucoasa gastrică de bovină	R_b = Leu, Phe, Trp, Tyr; $R_a \neq$ Pro	De asemenea, alții, foarte nespecific. pH_{optim}= 2
Elastaza	Pancreas de bovină	R_a = resturi neutre mici: Ala, Gly, Ser, Val; $R_b \neq$ Pro	
Endopeptidaza V_8	Staphylococus aureus	R_a = Glu	
Termolizina	Bacillus thermoprotheolyticus	R_b = Ile, Met, Phe, Trp, Tyr, Val; $R_a \neq$ Pro Ocazional scindează la: R_b = Ala, Asp, His, Thr	Stabilă la încălzire

Hidroliza parțială a proteinelor, pe lângă faptul că poate fi utilizată la determinarea structurii peptidelor (III.3.1.1.4), se produce şi în mod natural, prin transformarea unor proteine-zimogen, în enzime active (tripsina din tripsinogen, chimotripsina din chimotripsinogen şi pepsina din pepsinogen), pe cale autocatalitică sau cu alte enzime care îndepărtează hidrolitic anumite fragmente peptidice cu rol de inhibitori enzimatici naturali.

III.5.3. Metode generale de sinteză a peptidelor

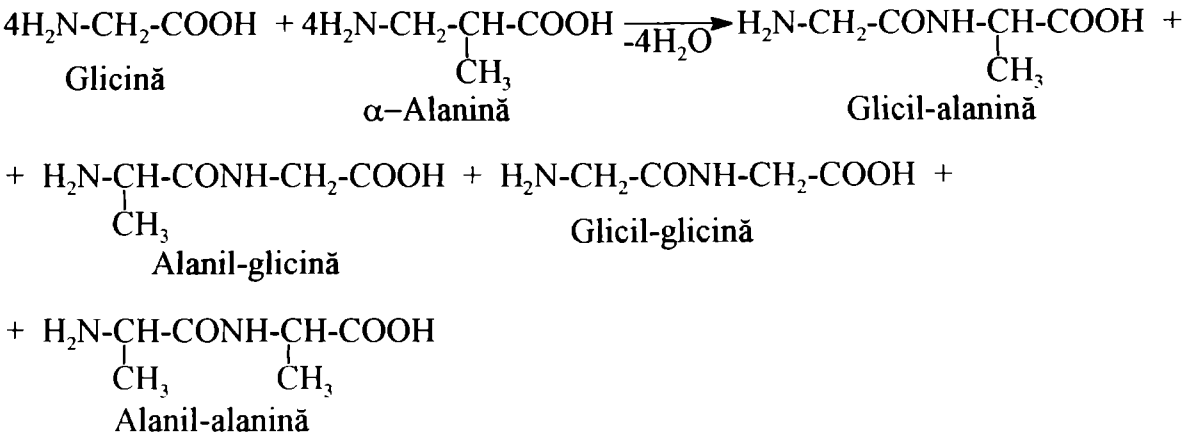
Pentru sinteza peptidelor există o serie de metode clasice, dar şi sinteza modernă, pe suport solid.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

III.5.3.1. Metode clasice de sinteză a peptidelor

Sinteza chimică a peptidelor a fost inițiată de E. Fischer în perioada 1900-1905, în cadrul unor cercetări întreprinse cu scopul de a confirma structura poliamidică a peptidelor şi proteinelor.

La formarea legăturii peptidice care uneşte două resturi de aminoacizi într-un compus peptidic, participă o grupă carboxil aparținând moleculei unui aminoacid şi grupa amino aparținând moleculei unui alt aminoacid. Ori, cum fiecare aminoacid are cel puțin o grupă amino şi una carboxil pe aceeaşi moleculă, apare inconvenientul producerii reacției la întâmplare între cele două grupe diferite, din care se formează mai multe peptide în amestecul de reacție. Luând ca exemplu reacția simplă dintre doi aminoacizi, se obține un amestec de patru dipeptide:



În locul unei singure peptide a cărei sinteză se urmăreşte, apar patru şi acestea, în eventualitatea că reacția de condensare nu progresează în sensul obținerii de tri-, tetrapeptide etc.

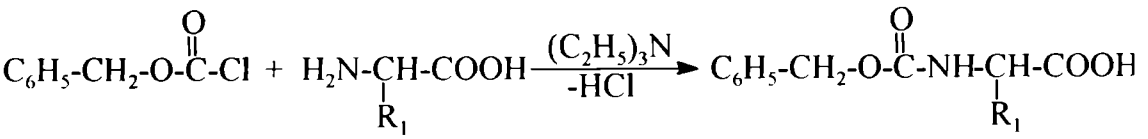
Dificultățile mari pe care le ridică sinteza efectuată astfel, constau în greutatea separării peptidei care interesează din amestecul complex de peptide rezultat şi în randamentul scăzut cu care aceasta se formează.

Dirijarea reacției în sensul obținerii numai a unei singure peptide, impune anumite etape de urmat: protejarea grupelor amino şi carboxil care nu trebuie să participe la reacție; activarea grupelor interesate în reacție; reacția de condensare propriu-zisă (peptidare); îndepărtarea grupelor protectoare prin reacții care nu produc racemizarea resturilor de aminoacizi, nu modifică grupele R laterale şi nu atacă legăturile peptidice din lanțul nou format, etape care vor fi prezentate în continuare.

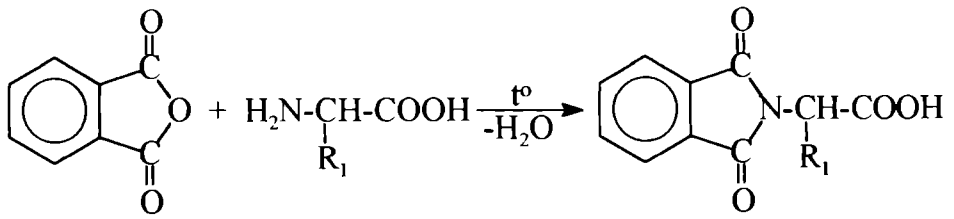
Protejarea grupei amino. Printre agenții de protejare a grupei amino mai des utilizați, se află clorura de benziloxicarbonil (clorocarbonat de benzil, $C_6H_5\text{-}CH_2\text{-}O\text{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}\text{-}Cl$), clorura de terțbutiloxicarbonil (clorocarbonatul de terțbutil, $(CH_3)_3C\text{-}O\text{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}\text{-}Cl$), anhidrida ftalică etc.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

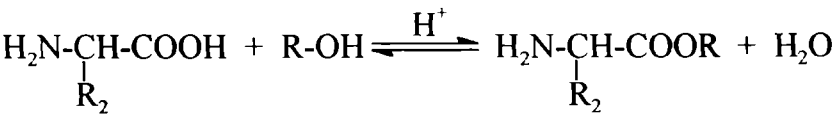
Exemplu:



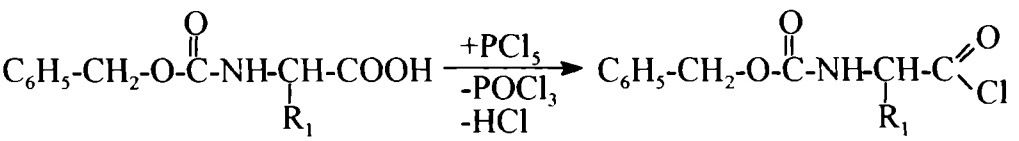
Protejarea grupei amino cu anhidrida ftalică (ftalilarea) este o metodă mai veche, utilizată mai des în laborator:



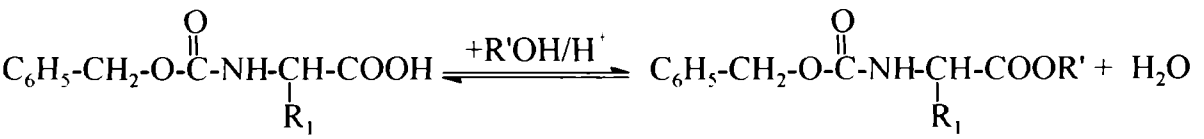
Protejarea grupei carboxil. Se face frecvent printr-o reacție de esterificare:



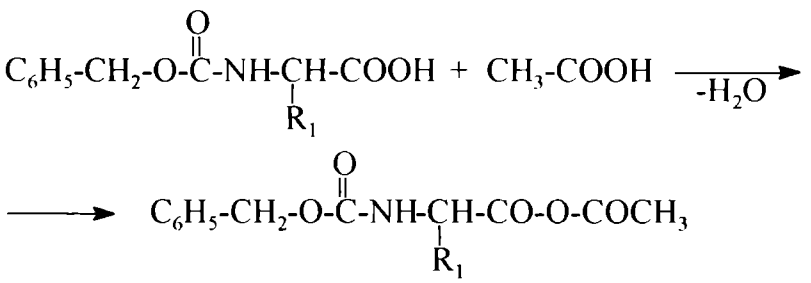
Activarea grupei carboxil necesară în reacție. Se realizează prin transformarea ei în clorură acidă:



O altă metodă de activare a grupei carboxil constă în transformarea sa în ester al unui alcool inferior (metilic, etilic):

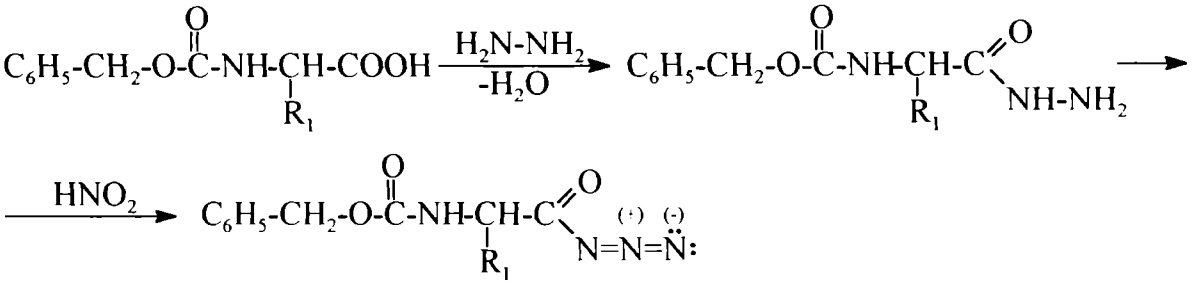


Anhidridele mixte sunt de asemenea mai reactive decât grupa carboxil:



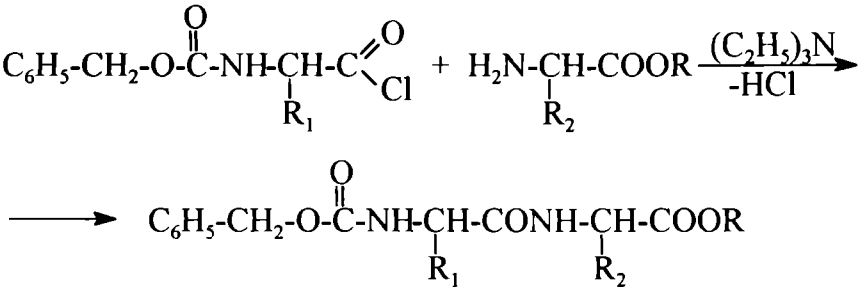
În 1902 a fost pusă la punct metoda de activare a grupei COOH prin transformarea sa în azidă. La ora actuală această metodă de activare este cel mai frecvent utilizată, fiind practic singura care nu conduce nici măcar la racemizarea parțială în etapa cuplării cu următorul aminoacid din secvența peptidei-țintă:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Azida fiind cel mai reactiv dintre derivații acizilor carboxilici, formează legătura peptidică în condiții blânde şi la temperaturi joase.

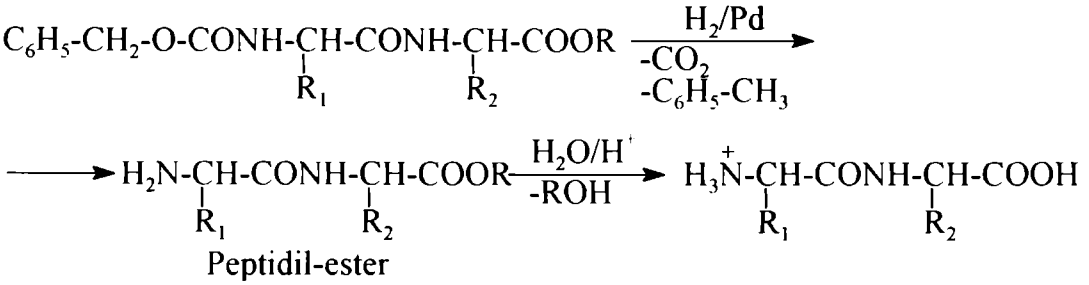
Reacția de condensare. Acesta este momentul formăii legăturii peptidice:



Se lucrează în mediu slab bazic pentru a asigura neprotonarea grupei α-amino reactive, captând HCl care se formează din reacție.

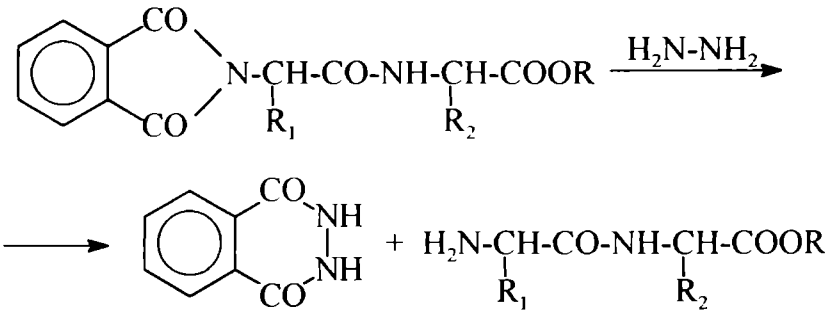
Dacă interesează dipeptida, se efectuează deprotejarea grupelor terminale, prin metode adecvate. Pentru sinteza unei peptide cu catenă mai lungă, pentru fiecare rest de aminoacid nou introdus, se face deprotejarea numai a grupei carboxilice precedente şi activarea ei, urmată de reacția de condensare cu esterul aminoacidului corespunzător secvenței dorite.

Îndepărtarea grupelor protectoare. Operația de îndepărtare a grupelor protectoare diferă în funcție de natura lor. În cazul de față, grupa benziloxicarbonil se elimină prin reducere catalitică pe paladiu, iar peptidil-esterul rămas se hidrolizează in condiții blânde, eliberând grupa carboxil terminală:



Grupa ftaloil, în calitate de grupă protectoare, se îndepărtează cu hidrat de hidrazină.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Grupa terțbutiloxicarbonil se îndepărtează cu acid bromhidric în acid acetic.

Prin metodele clasice, E. Fischer a sintetizat peptide cu până la 18 resturi de aminoacizi (octadecapeptide). Dezvoltarea fără precedent a cercetării biochimice în domeniul compușilor naturali a impulsionat sinteza chimică (fără intervenția enzimelor), în direcția obținerii de compuși peptidici biologic activi, întâlniți în natură. Astfel, V. du Vigneaud și colaboratorii săi au sintetizat în 1953 hormonii hipofizei posterioare, ocitocina și vasopresina, două nonapeptide.

Odată deschisă, calea aceasta a permis în continuare sinteza altor peptide naturale, ca bradikinina (nonapeptidă), hormonul melanocitostimulator (MSH, 24 resturi de aminoacizi), hormonul adrenocorticotrop (ACTH, 39 resturi de aminoacizi) etc. Metodele clasice au culminat cu sinteza insulinei, hormon pancreatic format din 51 resturi de aminoacizi, dispuși în două catene (catena A conține 21 resturi de aminoacizi și catena B – 30 resturi) prin strădania unor colective mari de cercetători din SUA, Germania și China, într-un interval mare de timp.

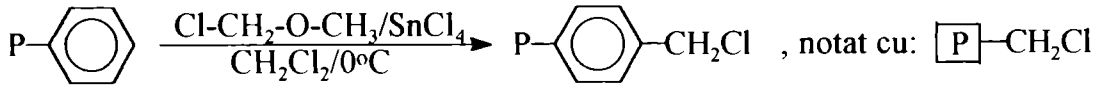
Totuși, această sinteză chimică clasică a peptidelor, anevoioasă și care necesită condiții energice, opune o serie de dificultăți practice în tentativa sintezei unor peptide cu structuri mai complicate și chiar a proteinelor, deoarece pe măsura accentuării complexității structurale, susceptibilitatea compușilor la diverse transformări crește. În plus, metoda fiind discontinuă, randamentul scade de la o etapă a condensării peptidice la alta, astfel încât randamentul global se diminuează dramatic în cazul obținerii unor polipeptide formate dintr-un mare număr de aminoacizi.

Inconvenientele au fost înlăturate de R. B. Merrifield în 1962, prin descoperirea metodei de sinteză a peptidelor pe suport solid.

III.5.3.2. Sinteza peptidelor pe suport solid (sinteza Merrifield)

Ingeniozitatea metodei constă în utilizarea unui compus macromolecular solid și insolubil, ca grupă protectoare. Agentul de protejare macromolecular conține anumite grupe funcționale reactive, capabile să reacționeze cu grupa carboxil. Un astfel de compus este copolimerul stiren-divinilbenzen, clorometilat la nucleele benzenice, prin reacția:

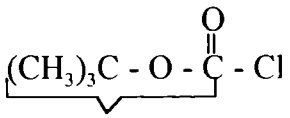
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Copolimer

Copolimer clorometilat
(suportul solid)

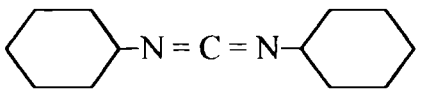
Reactivul pentru protejarea grupei amino este clorura de t-butiloxicarbonil, grupa t-butiloxicarbonil (BOC) fiind frecvent utilizată în aceste scopuri:



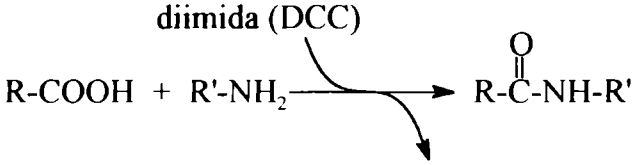
(BOC)

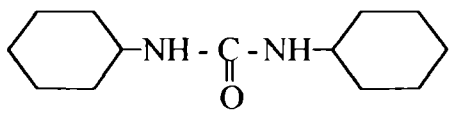
Clorură de terțbutil-
oxicarbonil

Agentul de condensare pentru formarea legăturii peptidice este diciclohexilcarbodiimida, care extrăgând o moleculă de apă din grupele –COOH şi $-NH_2$ libere, se transformă în diciclohexiluree:



Diciclohexil carbo-
diimida (DCC)



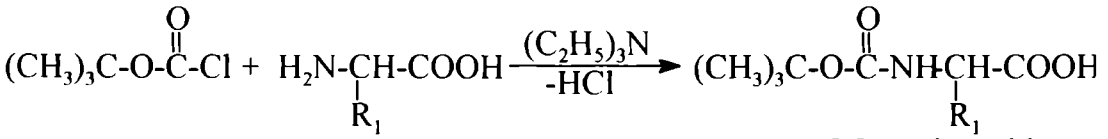


Diciclohexiluree
(DCU)

De fapt, după cum se observă din reacția de mai sus, DCC joacă rol şi de activator al grupei carboxilice din aminoacizii participanți la formarea grupei peptidice.

Spre deosebire de metodele clasice, sinteza pe suport solid începe cu aminoacidul C-terminal, principalele etape din desfăşurarea ei fiind prezentate în continuare.

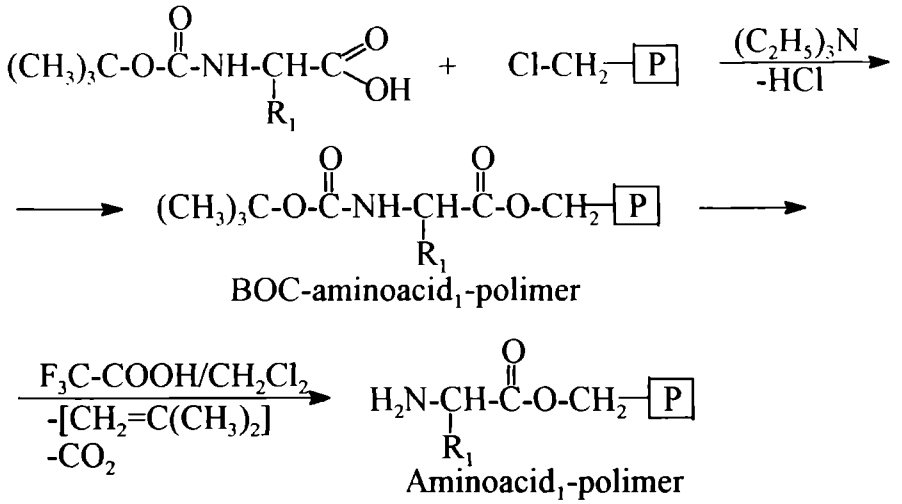
a)Protejarea grupei amino (exemplificare pe aminoacidul C-terminal al peptidei-țintă):



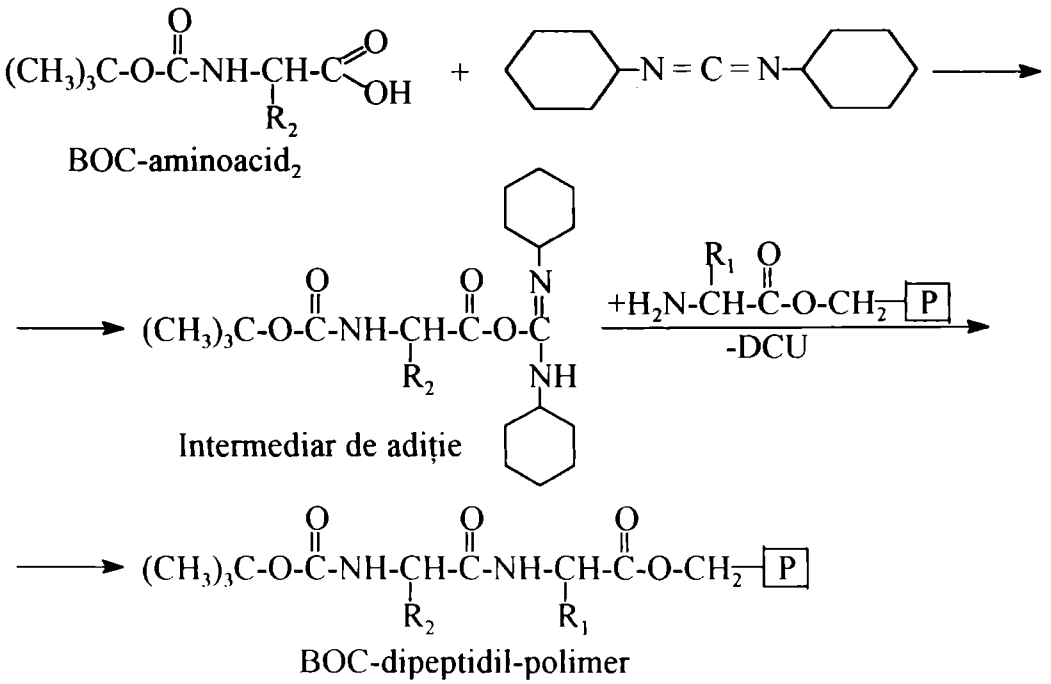
BOC-Aminoacid$_1$

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

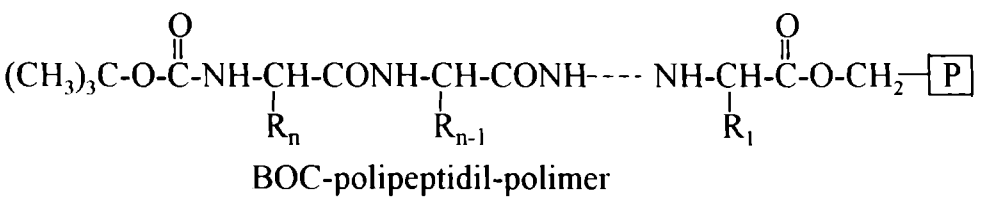
b)Fixarea primului aminoacid de suportul solid:



c)Reacția de formare a peptidei şi alungirea lanțului:



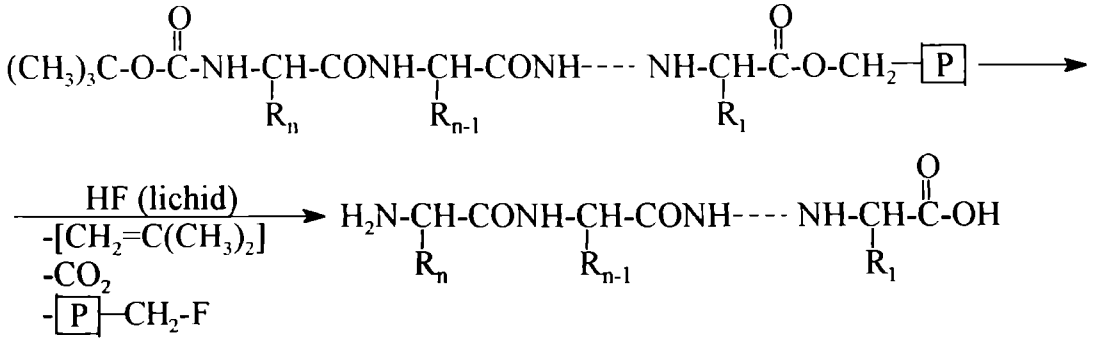
Dacă se doreşte o peptidă cu catena mai lungă, se efectuează asupra ultimului compus operația de deprotejare a grupei amino terminale cu acid trifluoracetic şi CH_2Cl_2, ca la punctul b), urmată de reacția de condensare ca la punctul c), pentru fiecare aminoacid dorit în secvență. Se ajunge în final la o peptidă sau o polipeptidă-țintă cu ambele grupe terminale protejate:



https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

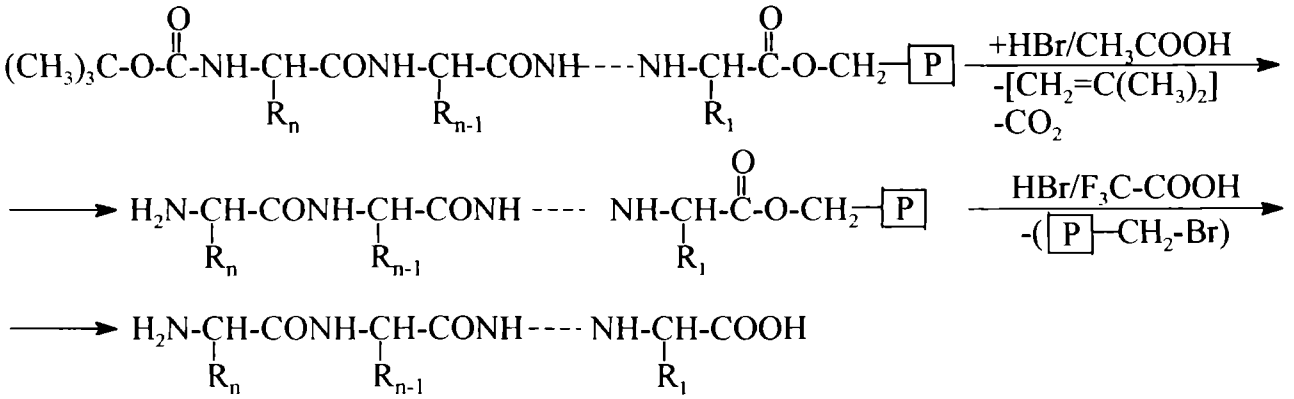
d)Îndepărtarea grupelor protectoare:

Peptida-țintă liberă se obține prin îndepărtarea grupei BOC (de la grupa amino terminală) și a suportului solid (de la grupa C- terminală). Ambele grupe sunt eliminate prin tratare cu HF lichid.



Într-o altă variantă de lucru intervin unele modificări, precum îndepărtarea grupei BOC protectoare care se realizează, pentru fiecare etapă în parte, prin tratarea peptidei protejate la ambele capete cu acid bromhidric în acid acetic. Din reacție se degajă izobutilenă și dioxid de carbon, concomitent cu eliberarea grupei amino terminale.

Pentru eliberarea și a grupei C-terminală se tratează produsul în continuare, cu HBr în acid trifluoracetic, obținându-se peptida liberă și polimerul bromometilat.



Suportul solid se regenerează sub formă de bromometilderivat, mai reactiv decât clorometilderivatul folosit inițial, utilizabil într-o nouă sinteză de peptide.

Față de metodele clasice de sinteză a peptidelor, metoda Merrifield prezintă următoarele avantaje:

-reacția (pe etape și per total) se produce cu randamente mari;

-toate reacțiile și operațiile aferente fiecărei etape de sinteză se efectuează într-o singură instalație, ceea ce înseamnă economie de spațiu, timp și aparatură;

-după fiecare reacție, agenții de condensare, de protejare, reactivii nereacționați și excesul de reactivi se îndepărtează printr-o simplă operație de spălare, obținându-se peptida legată de suport (insolubilizată) la un grad avansat de puritate;

-instalația se pretează la îmbunătățiri și perfecționări continue, permițând automatizarea și computerizarea întregului proces de sinteză.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Îmbunătățiri s-au adus şi în unele etape ale sintezei, cum este utilizarea unor derivați ai diciclohexilcarbodiimidei, solubili în mediul de reacție, care uşurează mult operațiile de prelucrare a amestecului de reacție.

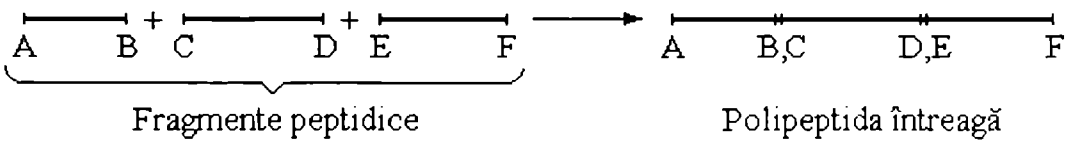
Prin toate aceste avantaje, metoda Merrifield a jucat un rol deosebit, în primul rând, la confirmarea şi prin sinteză chimică a structurii unor compuşi naturali biologic activi, de natură peptidică sau în scopul obținerii lor pentru utilizări în terapeutică. Câteva exemple sunt edificatoare: pentru cele 9 resturi de aminoacizi din secvența bradikininei a fost nevoie de 27 ore de lucru, revenind trei ore pentru fiecare rest, randamentul total al sintezei fiind 85%; sinteza catenei A din molecula insulinei, cu 21 resturi de aminoacizi, a durat 8 zile, iar a catenei B, cu 30 resturi de aminoacizi, 11 zile; în total sinteza acestui hormon pancreatic cu 51 resturi de aminoacizi în structură a durat 19 zile.

Ribonucleaza pancreatică bovină a fost sintetizată prin metoda Merrifield din 124 aminoacizi constituenți, în urma a 369 reacții chimice diferite, utilizate în 11931 etape, cu un randament global de 90%.

Operativitatea metodei față de procedeele clasice care au necesitat ani de zile de muncă, a unor întregi colective de cercetare este incontestabilă.

O altă metodă de sinteză modernă a peptidelor cu catene lungi (polipeptide) şi a proteinelor constă în sinteza separată a fragmentelor mai mici, părți componente ale secvenței unei polipetide sau proteine şi asamblarea lor corectă, prin metode adecvate.

Exemplu:



Şi această metodă a dat rezultate foarte bune în cazul sintezei ribonucleazei pancreatice bovine sintetizate anterior prin metoda Merrifield.

III.6. Peptide naturale

Materia vie este sediul în care se găsesc şi îşi exercită activitatea un număr mare de compuşi peptidici, cu anumite funcții bilogice.

Spre deosebire de peptidele derivate din proteine (peptidele proteice), unde la formarea grupelor peptidice participă numai grupele α-amino şi α-carboxil din aminoacizi, multe dintre peptidele naturale au în structură grupe peptidice formate din funcțiuni NH_2 şi COOH situate în poziții β- sau γ-, de la L- şi D-aminoacizi sau chiar derivați ai acestora (peptidele neproteice).

Alte legături peptidice apar în unele structuri, unde alături de aminoacizi sunt şi acizi carboxilici cu funcțiuni mixte, stabilind împreună grupe peptidice, asamblate într-un edificiu molecular funcțional (de exemplu, depsipeptidele).

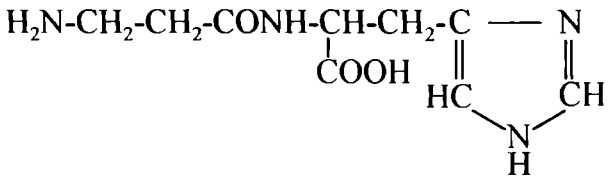
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Peptidele proteice se formează prin hidroliza parțială a proteinelor. Peptidele neproteice sunt biosintetizate în organism, după un mecanism diferit de cel al biosintezei proteinelor. Biosinteza acestor peptide se face enzimatic, fără participarea ribozomilor sau a ARNm.

Importanța şi rolul biologic al acestor peptide naturale vor fi menționate în continuare, pentru reprezentanții mai importanți sau grupe de peptide.

III.6.1. Peptide neproteice

A.Carnozina (β-alanil-L-histidina). Este o dipeptidă în care aminoacidul β-alanina formează, prin grupa carboxilică, o legătură peptidică cu L-histidina.

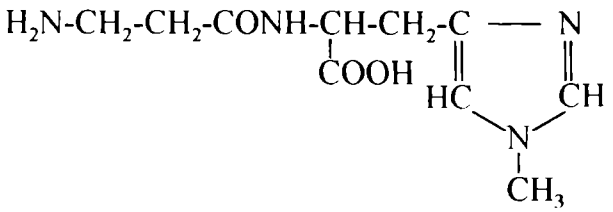


Având în structură un β-aminoacid, carnozina face parte dintre peptidele atipice. Prezența în moleculă a unui carbon asimetric conferă dipeptidei activitate optică, având doi enantiomeri. Izomerul natural este L(+)-carnozina, substanță solidă, cristalină, cu t.t.=245-250°C (desc.), solubilă în apă. Formează clorhidrați şi nitrați solubili în apă. D(-)-Carnozina, celălat izomer optic, este o substanță solidă, cristalină, cu t.t.=260°C.

Carnozina se găseşte în muşchii mamiferelor, de unde a şi fost izolată. Are caracter bazic şi este hidrolizată de carnozinază, o metaloenzimă (prezentă în ficat, rinichi şi splină) activată de ionii Zn^{2+} şi Mg^{2+}. Acțiunea acestei enzime este nespecifică, hidrolizând şi alte peptide în structura cărora intră histidina.

Carnozina are proprietăți hipertensive, stimulează acțiunea motorie şi activitatea secretorie a intestinelor. Sub formă de carnozin-fosfat este un donor de resturi fosfat în procesul de contracție musculară.

B.Anserina (β-alanil-1-metil-L-histidina). Este derivatul N-metilat în poziția 1 al carnozinei:



Structural, este o dipeptidă atipică, izolată prima dată din muşchii păsărilor şi, ulterior, din muşchii mamiferelor.

După Harms şi Winnick, biosinteza anserinei poate avea loc în două moduri:

a)Condensarea β-alaninei cu 1-metilhistidină;

b)Metilarea carnozinei.

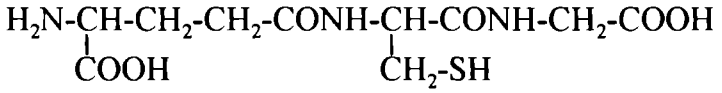
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Argumentele în sprijinul acestei afirmații au fost aduse prin sinteza cu atomi marcați (^{14}C). Introducând în organismul animal ^{14}C-carnozină, după un anumit timp s-a identificat prin analiză ^{14}C-anserina. Este clar că a avut loc o reacție de transmetilare şi că grupa metil din ^{14}C-anserină provine de la S-adenozil metionina nemarcată.

Se crede că rolul biologic al anserinei se aseamănă cu rolul carnozinei.

În ciuda faptului că cele două dipeptide – carnozina şi anserina – se cunosc de multă vreme ca produşi biologic activi, apărând în țesuturile mamiferelor în cantități oarecum importante, despre funcțiile lor biologice se cunoaşte puțin.

C.Glutationul (γ-L-glutamil-L-cisteinil-glicina). Glutationul este o tripeptidă atipică, formată din resturi de acid glutamic, cisteină şi glicină:



În structura glutationului, acidul L-glutamic participă la formarea grupei peptidice cu cisteina, prin grupa γ-carboxilică şi nu α-carboxilică, specifică proteinelor sau peptidelor derivate din proteinele naturale.

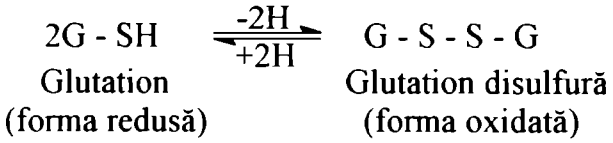
Glutationul este o substanță solidă, cristalină, de culoare albă, cu t.t.=190-192°C (cu descompunere), solubilă în apă şi insolubilă în solvenți organici. Este un compus netoxic şi are gust acru. Prezintă activitate optică. Izomerul natural este levogir, având rotația specifică $[\alpha]_D = -85^o$.

Glutationul se găseşte pretutindeni în materia vie, mai mult decât oricare altă peptidă simplă. Este prezent în majoritatea organelor vegetale, în special în semințe, unde concentrația sa creşte foarte mult în perioada încolțirii.

Deşi se găseşte în toate țesuturile animale, organele mai bogate în glutation (exprimat în mg glutation/100g țesut) sunt, în ordine: ficatul (145-175), splina (76-118), inima (64-67), creierul (32) şi muşchii (26).

Prin funcția sa biologică, glutationul participă la diverse procese biochimice, metabolice, de detoxifiere, de transport şi de echilibru între formele sale redusă (G-SH) şi oxidată (G-S-S-G), menținând grupele sulfhidril ale proteinelor naturale intracelulare în starea lor oxidată, corectă.

Grupa tiolică (-SH) din moleculă fiind sensibilă față de agenții oxidanți, condiționează trecerea glutationului sub formă de disulfură (forma oxidată), care la rândul său, fiind sensibilă la agenții reducători, reface glutationul (forma redusă).

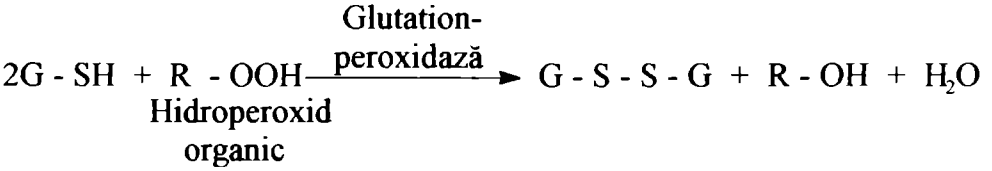


https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

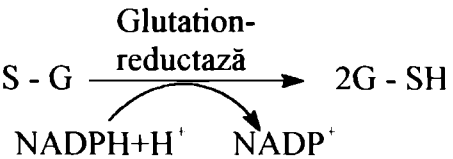
Prin aceste proprietăți, glutationul funcționează ca o substanță oxidoreducătoare importantă, luând parte la procese de oxidoreducere celulară din organismele vii. Este deci un transportor neenzimatic de hidrogen. Poate reduce acidul dehidroascorbic la acid ascorbic propriu-zis.

În formă redusă, glutationul protejează acidul ascorbic şi adrenalina împotriva oxidării, iar lipidele – împotriva peroxidării.

Un rol important are glutationul într-un proces de detoxifiere, prin distrugerea reductivă a apei oxigenate şi a hidroperoxizilor organici din eritrocite. Apa oxigenată provenită din diverse procese oxidative este toxică pentru organism. Ea reacționează cu resturile nesaturate ale acizilor graşi din membranele eritrocitelor, formând hidroperoxizi organici, care rup legăturile C-C din apropiere, producând degradarea membranelor. Peroxizii sunt distruşi sub acțiunea glutationului şi a glutation peroxidazei, una din puținele enzime cu un cofactor de seleniu, formând glutation disulfura. Glutationul funcționează în acest caz ca substrat al peroxidazei:



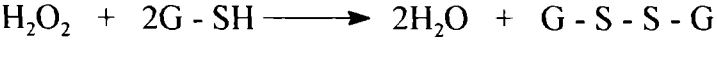
Glutation disulfura este redusă la glutation sub acțiunea glutation reductazei:



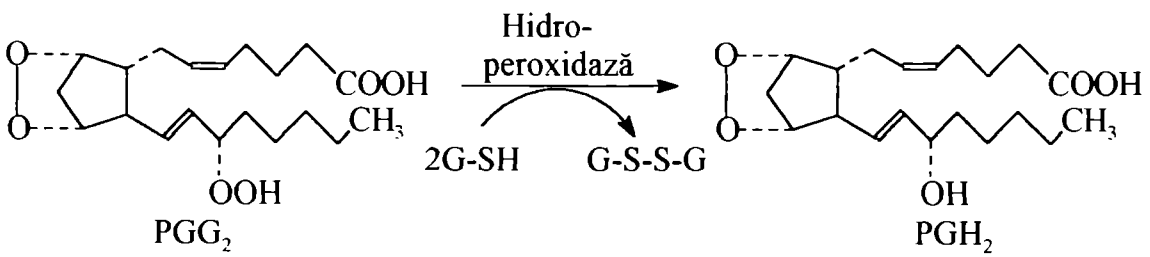
Din această cauză, prezența coenzimei NADPH este foarte benefică pentru integritatea eritrocitelor.

Reacțiile de mai sus scot în evidență implicațiile glutationului în procesul de detoxifiere a apei oxigenate şi hidroperoxizilor din organism.

Pentru distrugerea H_2O_2, glutationul participă în formă redusă la reacții enzimatice, cu rol de coenzimă, fiind donor de hidrogen. Un exemplu este descompunerea apei oxigenate sub acțiunea enzimei glutation: peroxid de hidrogen oxidoreductaza:



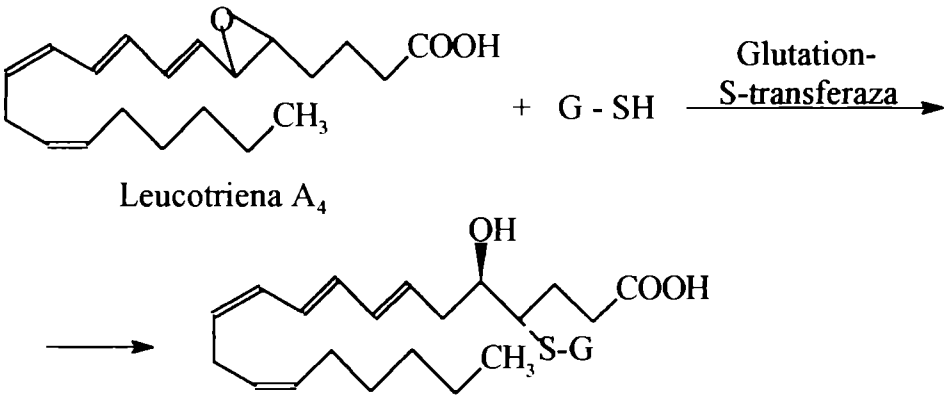
Glutationul participă şi în anumite etape ale biosintezei prostaglandinelor şi leucotrienelor. În primul caz intevine în etapa:



https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Compusul prostaglandinic PGH_2 este precursorul imediat al prostaglandinelor, prostaciclinelor şi tromboxanilor (vezi prostaglandine). În al doilea caz, glutationul intervine într-o etapă a unei succesiuni de reacţii implicate în biosinteza leucotrienelor.

Se adiţionează prin grupa –SH la grupa oxiranică a leucotrienei A_4, sub acţiunea catalitică a glutation-S-transferazei, formând prima dintre peptidoleucotriene, leucotriena C_4 (vezi leucotriene).



Leucotriena A_4

Leucotriena C_4

Glutationul mai este un component important într-un sistem de transport al aminoacizilor din exterior, în interiorul celulelor multor ţesuturi animale (fig.III.4). În mecanismul acestui proces biochimic acţionează 6 enzime, notate A-F în figură. Una dintre ele, γ-glutamil transferaza (A) este legată de membrana celulară, având un rol esenţial în desfăşurarea procesului. Restul enzimelor se află în citosol.

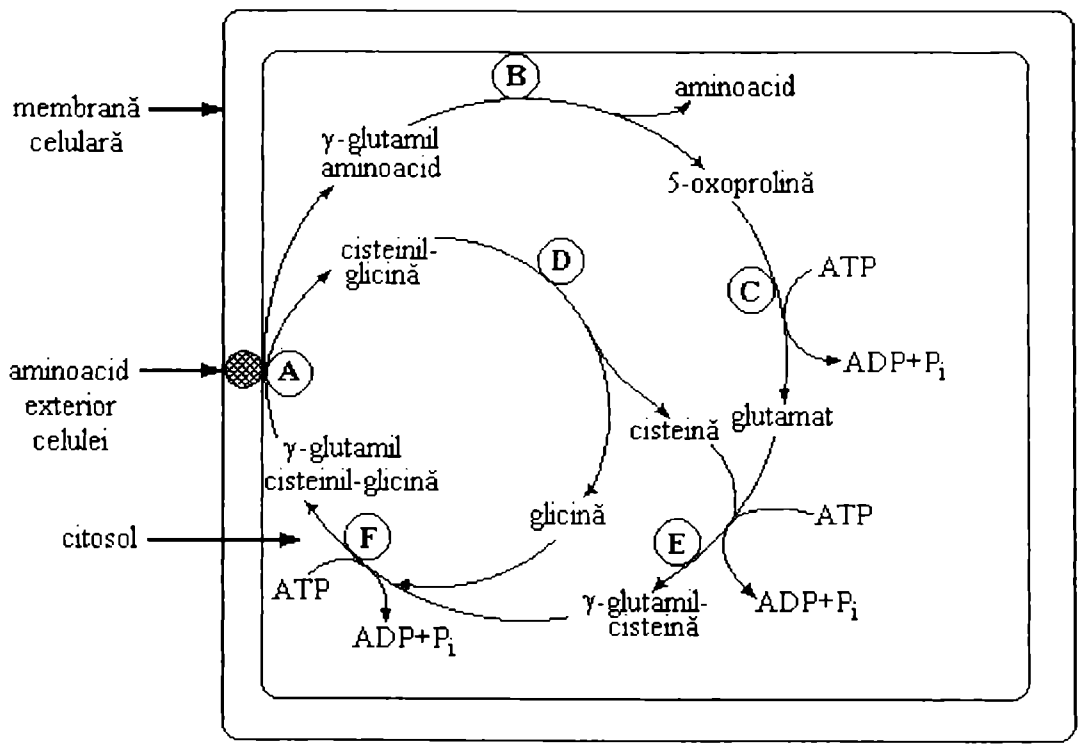


Fig.III.4 – Transportul aminoacizilor din exterior în celulă

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

unde: A=γ-glutamil-transferaza legată de membrană;

B=γ-glutamil-ciclotransferază;

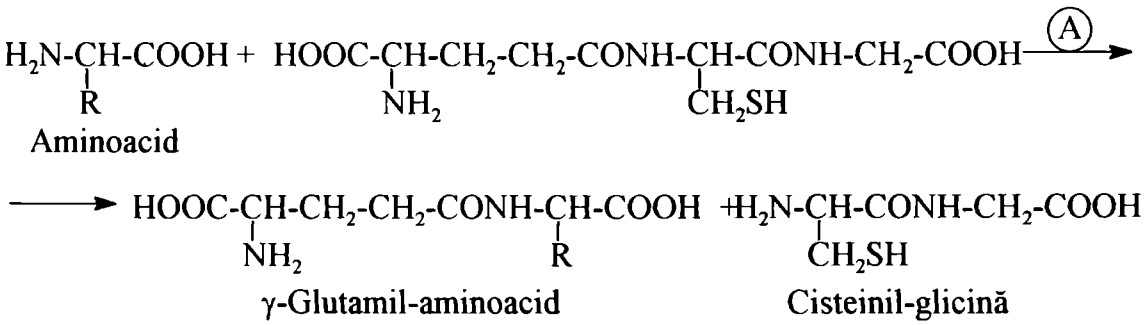
C=5-oxoprolinază;

D=peptidază;

E=γ-glutamil-cisteinsintetază;

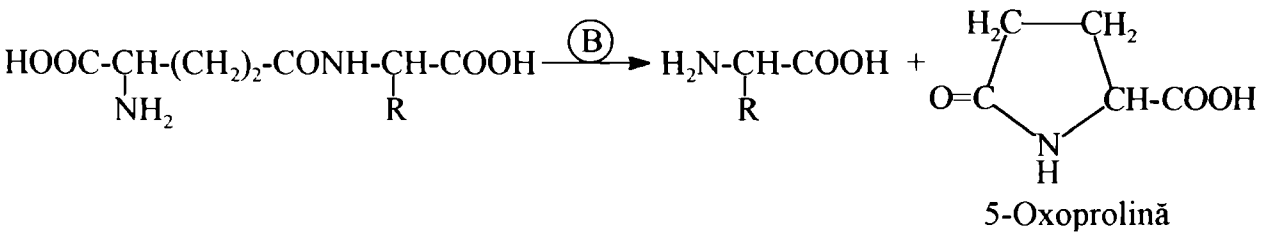
F=glutation sintetază.

Enzima A transferă restul de glutamil de la glutation la oricare aminoacid comun care traversează membrana celulară, cu excepția prolinei.

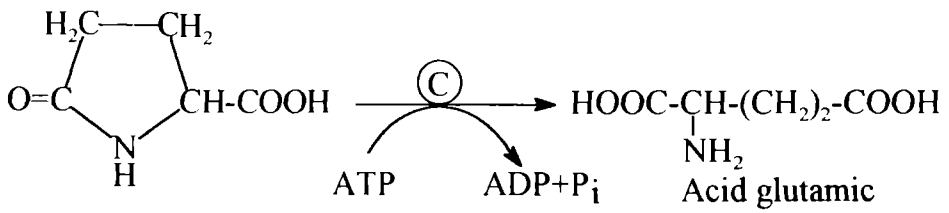


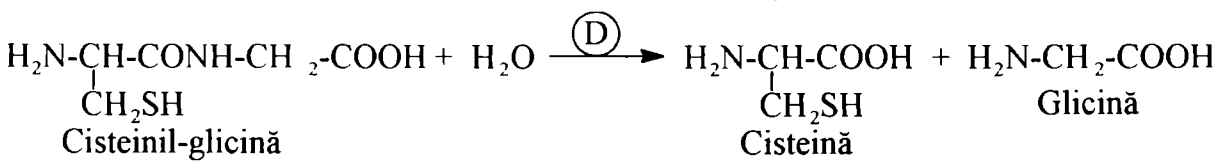
Cele două dipeptide formate trec în citosol, urmând alte sevențe de reacție.

Sub acțiunea γ-glutamil-ciclotransferazei, γ-glutamil-aminoacidul eliberează aminoacidul în citosol, iar restul γ-glutamil se ciclizează la 5-oxoprolină.



5-Oxoprolinaza, cu participarea unei molecule de ATP, catalizează transformarea 5-oxoprolinei în acid glutamic, în timp ce cisteinilglicina suferă a reacție de hidroliză catalizată de o peptidază, dezmembrându-se în cisteină și glicină.

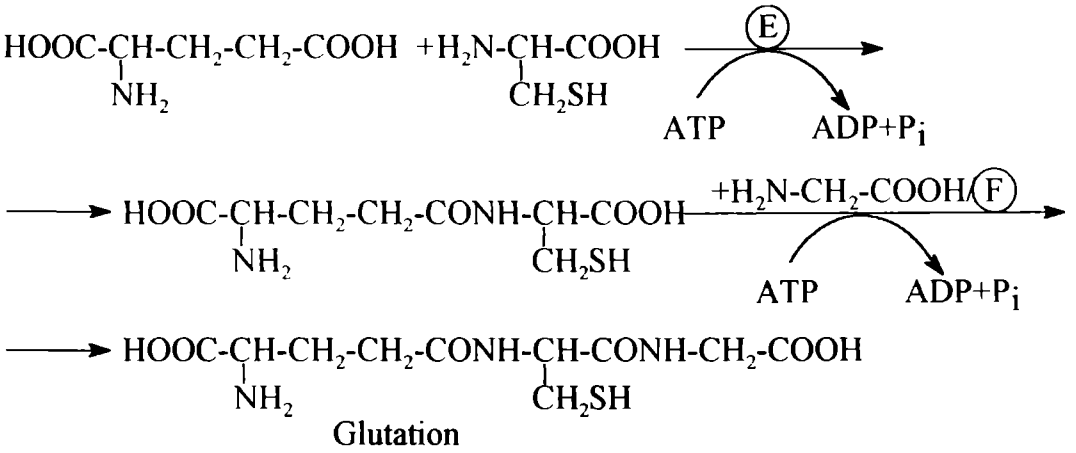




În acest stadiu, glutationul din citosol se află dezmembrat în cei trei aminoacizi ai săi. Etapele care urmează au ca scop refacerea moleculei de glutation, din acid glutamic, cisteină și glicină, cu participarea consecutivă a γ-glutamil-cisteinsintetazei (E) și glutation sintetazei (F).

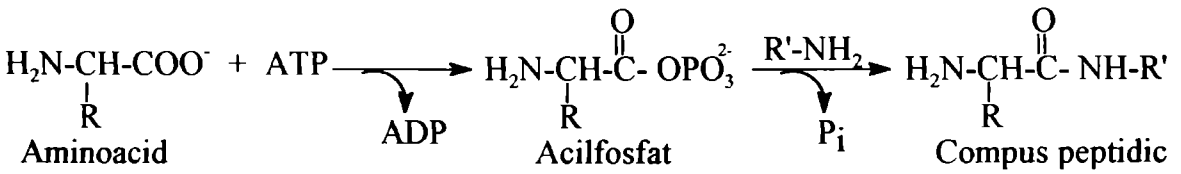
Energia necesară acestor reacții este furnizată de ATP.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Glutation

Pentru aceste reacții de biosinteză, grupa carboxilică a aminoacizilor este activată în forma unui acilfosfat intermediar.



Aminoacid Acilfosfat Compus peptidic

Încheierea unui astfel de ciclu are ca rezultat introducerea unei molecule de aminoacid în celulă şi refacerea glutationului, care poate reîncepe un nou ciclu de reacții.

Din fig.III.4 se constată că pentru fiecare moleculă de aminoacid transportat din exteriorul celulei în interiorul ei, se desfăşoară un întreg ciclu de reacții, la care participă direct 6 enzime, trei molecule de ATP şi o moleculă de glutation.

Grupa peptidelor cuprinde un număr mare de termeni naturali sau sintetici, mulți dintre ei având proprietăți biologice remarcabile ca: vitamine, hormoni, peptide hipo- şi hipertensive, cu activitate toxică etc. Multe dintre acestea se încadrează mai bine în alte capitole (de exemplu: vitamine, hormoni etc.) şi vor fi descrise la locul potrivit.

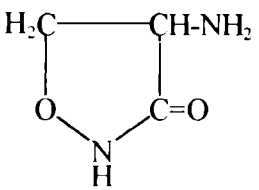
III.6.2. Peptide cu acțiune antibiotică sau toxică

Anumite microorganisme au capacitatea de a sintetiza oligopeptide ciclice, care manifestă o puternică acțiune antibiotică, iar unele specii vegetale şi ciuperci produc peptide sau proteine toxice.

În marea lor majoritate, antibioticele produse de bacterii au structură de natură peptidică.

III.6.2.1. Cicloserina (oxamicina sau seromicina)

Denumirea ştiințifică a cicloserinei este D-4-amino-3-izoxazolidinonă:

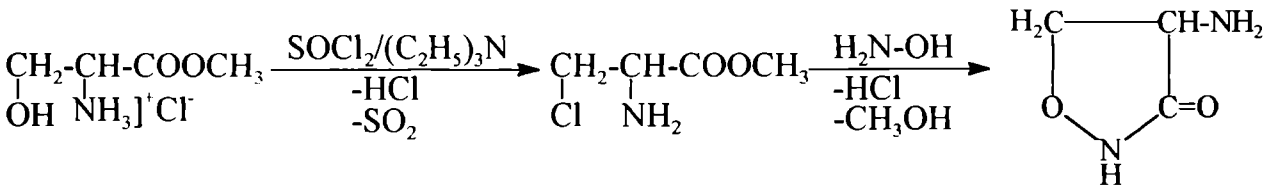


Cicloserina

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Cicloserina este o substanță solidă, cu structură peptidică ciclică. Are caracter amfoter şi se topeşte la 156°C.

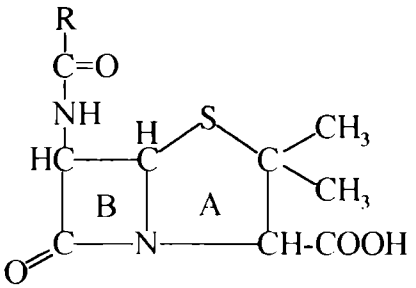
Diferite specii de Streptomyces (orchidaceus, graphalus şi lavendulae) produc cicloserină, substanță care poate fi obținută şi prin sinteză chimică. Una dintre metodele folosite porneşte de la clorhidratul serinatului de metil, după cum urmează:



Cicloserina are un spectru antibiotic larg, dar mai slab decât alte antibiotice. Totuşi, este activă față de bacilul Koch. Se foloseşte asociată în tratamentul împotriva tuberculozei pulmonare şi extrapulmonare, în formele cronice şi rezistente la alte antibiotice (streptomicină) şi HIN (hidrazida acidului izonicotinic). Asociată cu penicilina, cicloserina poate fi utilizată şi în infecțiile stafilococice. Mai are întrebuințări în tratamentul împotriva leprei şi a infecțiilor urinare, rezistente la alte antibiotice.

III.6.2.2. Peniciline

Penicilinele formează o grupă de substanțe antibiotice, dintre cele mai importante, produse de diferite tipuri de mucegaiuri, în principal Penicillium notatum şi Penicillium chrysogenum.



Penicilină
(formulă generală)

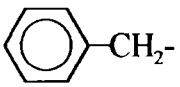
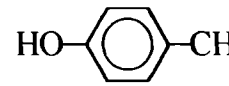
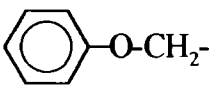
Structura penicilinei conține un ciclu tiazolidinic (A) condensat cu un ciclu β-lactamic (B). De ciclul B se leagă un radical R, printr-o legătură peptidică.

Prima penicilină a fost descoperită de microbiologul englez A. Fleming, în 1929 şi folosită pentru prima dată în medicină, în 1948, ca antibiotic, în combaterea unor boli microbiene.

Prin sinteza biologică nedirijată, produsul obținut nu este unitar, ci un amestec de peniciline cu structuri foarte înrudite, dar cu activitate biologică diferită. Toate aceste peniciline corespund formulei de mai sus, diferind între ele numai prin radicalul R.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabelul III.2 – Peniciline naturale

Denumirea penicilinei	Radicalul R		U.I.
	Denumire	Structură	
F	Δ^2-Pentenil	CH_3-CH_2-CH=CH-CH_2-	1500
Dehidro-F (acid gigantic)	n-Amil	CH_3-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-	1670
G	Benzil		1667
X	p-Hidroxibenzil		850-900
K	n-Heptil	$CH_3(CH_2)_5$-CH_2-	2300
V	Fenoximetil		1630
O	Alilmercaptometil	CH_2=CH-CH_2-S-CH_2-	1630

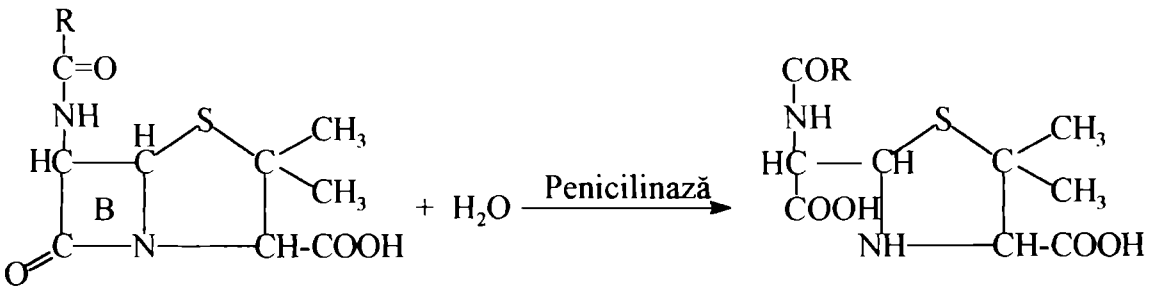
Când se urmăreşte obţinerea cu precădere a unui anumit tip de penicilină, trebuie avut în vedere că acesta depinde de natura mucegaiului şi condiţiile lui de cultivare. Cea mai indicată este penicilina G, pentru utilizare în medicină, având în vedere activitatea, stabilitatea şi accesibilitatea fabricării ei. Dacă în mediul de cultură sunt prezenţi anumiţi precursori, microorganismul îi preia gata formaţi, direcţionând biosinteza unei anumite peniciline, în defavoarea altora. Spre exemplu, utilizând în mediul de cultură a acidului fenilacetic sau a fenilacetamidei ca precursori, se obţine industrial penicilina G, fără alte substanţe analoge însoţitoare.

Penicilina are acţiune bacteriostatică şi bactericidă asupra stafilococilor şi, în general, asupra microorganismelor Gram-pozitive. Penicilina împiedică formarea membranelor celulare, fără de care microorganismul îşi pierde forma proprie, caracteristică, devenind sferic şi se distruge cu uşurinţă.

Activitatea antibiotică a penicilinei se exprimă în unităţi internaţionale (U.I.) pe miligram de substanţă. O unitate internaţională corespunde activităţii specifice a 0,6γ sare de sodiu a penicilinei G, pură, faţă de o tulpină standard de Staphylococcus aureus. Prin urmare, 1mg penicilină conţine 1667 U.I.; 1mega-unitate corespunde la 10^6 U.I.

Penicilina este scindată hidrolitic la legătura peptidică din ciclul β-lactamic (B) de către penicilinaze, enzime produse de anumite microorganisme (de exemplu, de Staphylococcus aureus sau de Bacillus licheniformia) cu formarea acidului peniciloic, inactiv biologic.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



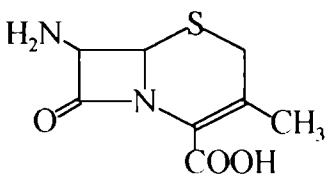
Acid peniciloic

Producerea acestor enzime poate fi indusă în bacterii în cursul tratamentelor cu penicilină (enzime adaptative). Microorganismele devin astfel, prin mecanismul respectiv, penicilin rezistente, ceea ce obligă utilizarea terapeutică a unor noi peniciline obținute prin semisinteză.

III.6.2.3. Cefalosporine

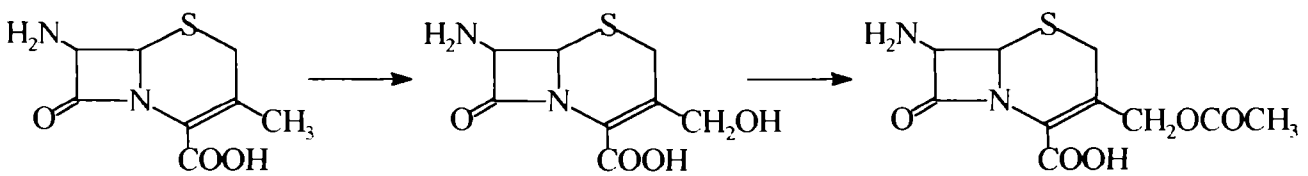
Această clasă de antibiotice include compuşi cu un spectru de acțiune mai larg decât cel al penicilinelor.

Cefalosporinele se obțin din peniciline, pe cale fermentativă sau prin semisinteză chimică. Prima etapă constă în lărgirea ciclului de cinci atomi (tiazolidinic) din molecula penicilinei, la ciclul de 6 atomi (dihidrotiazinic), caracteristic cefalosporinelor. Lărgirea de ciclu este însoțită de o dezacilare a grupei amino din poziția 6 a moleculei penicilinei. Se obține acidul 7-amino-dezacetoxicefalosporanic (7-ADCA), intermediar în semisinteza cefalosporinelor:



7-ADCA

Din 7-ADCA se obțin: acidul dezacetil-7-aminocefalosporanic şi acidul 7-aminocefalosporanic:



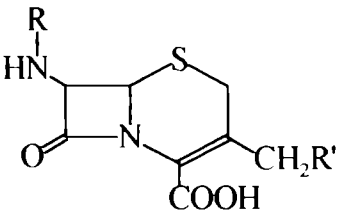
Acid dezacetil-7-amino-cefalosporanic

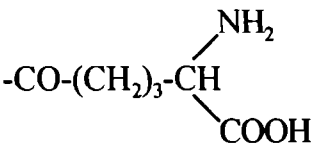
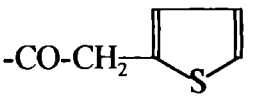
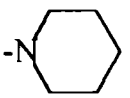
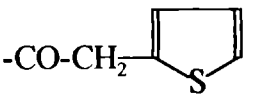
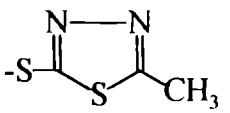
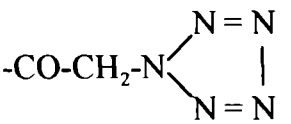
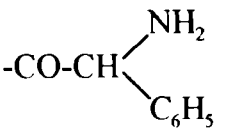
Acid 7-amino-cefalosporanic

Aceşti doi acizi din urmă sunt, la rândul lor, intermediari pentru o serie de cefalosporine (tabelul III.3).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabelul III.3 – Exemple de cefalosporine de forma



Denumirea cefalosporinei	R'=	R=
Cefalosporina C	$-OCOCH_3$	
Cefalotina	$-OCOCH_3$	
Cefacetil	$-OCOCH_3$	$-CO-CH_2-CN$
Cefalolisina		
Cefazolina		
Cefalexina	-H	

Astfel, cefalotina şi cefazolina sunt reprezentanți ai generației I-a (cefalosporine de bază).

Cefalotina este activă față de o serie de bacterii Gram-pozitive (cu excepția enterococului) şi Gram-negative (E. coli, Proteus mirabilis, Klebsiela) anaerobe.

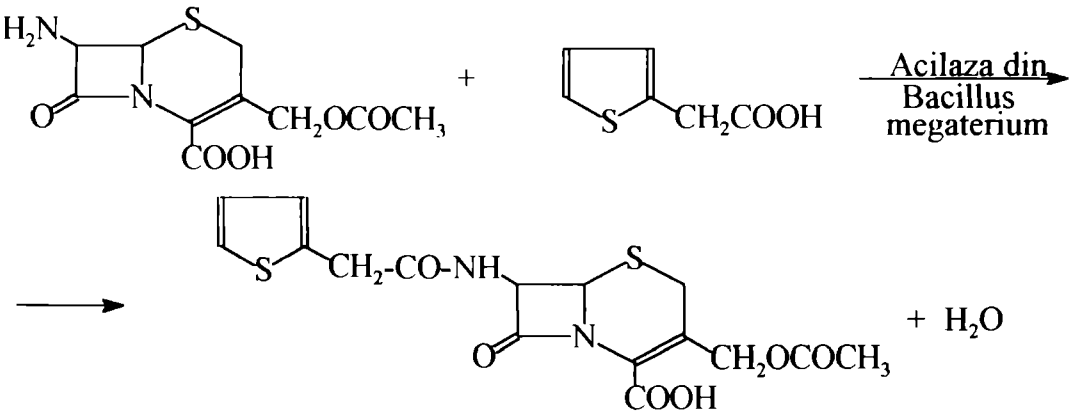
Cefazolina este mai activă decât cefalotina față de bacteriile Gram-negative.

Gama cefalosporinelor de semisinteză s-a extins cu cele din generația a IIa şi a IIIa, toate derivând în ultima instanță de la scheletul 7-ADCA.

În general, se preferă metode enzimatice de semisinteză a cefalosporinelor, care prezintă avantajul major față de metodele chimice, prin aceea că nu necesită protejarea grupelor reactive din moleculele intermediarilor.

De exemplu, cefalotina se obține industrial din acid 7-aminocefalosporanic şi acid 2-tiofenacetic, în prezența acilazei din Bacillus megaterium, imobilizată pe celit:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



III.6.2.4.Gramicidine

Substanțele aparținând acestei grupe sunt oligopeptide ciclice cu proprietăți antibiotice, produse de microorganismul Bacillus brevis.

Cultivate în anumite condiții şi medii nutritive, tulpinile microorganismului produc mai multe asemenea substanțe, dintre care cele mai cunoscute sunt gramicidinele A, B, S şi J. Proprietățile şi acțiunea antibiotică sunt dependente de structura lor, respectiv de numărul, natura şi secvența resturilor de aminoacizi din lanțul ciclopeptidic.

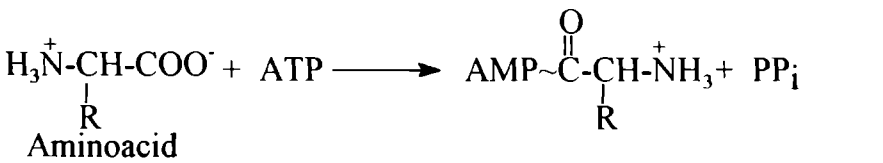
Gramicidinele sunt substanțe solide, greu solubile în apă, termostabile şi nu se descompun prin autoclavare la 130°C. Rezistă la încălzire în soluții de HCl 1% sau H_2SO_4 25%.

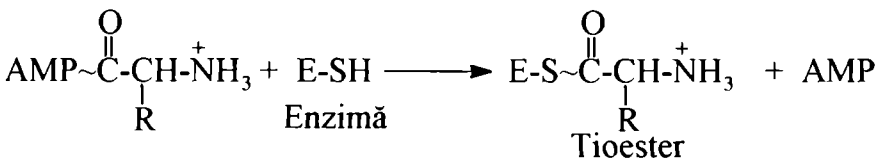
Gramicidina S. Este o decapeptidă ciclică, conține în moleculă resturi de L- şi D-aminoaczi dispuşi în două catene pentapeptidice identice şi simetrice, unite cap-coadă prin două legături peptidice (III.2).

Gramicidina are masa moleculară 1KDa. Are în structură cinci aminoacizi diferiți, fiecare de câte două ori. Gramicidina S se formează ca un produs metabolic, sintetizat de microorganismul Bacillus brevis.

Fritz Lipman a demonstrat că această decapeptidă este sintetizată de un complex enzimatic solubil, numit gramicidin sintetază, format din două enzime: E_1 cu masa moleculară de 280KDa şi E_2 cu masa de 100KDa.

Toți aminoacizii implicați în biosinteza gramicidinei sunt mai întâi activați prin intermediul ATP şi legați la enzima corespondentă printr-o legătură tioesterică.



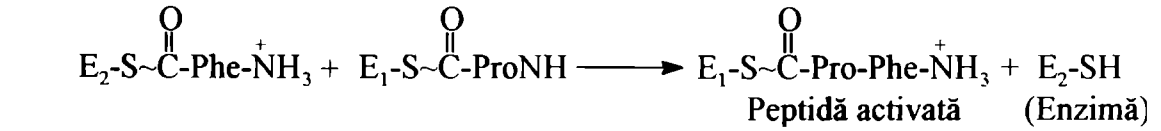


https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

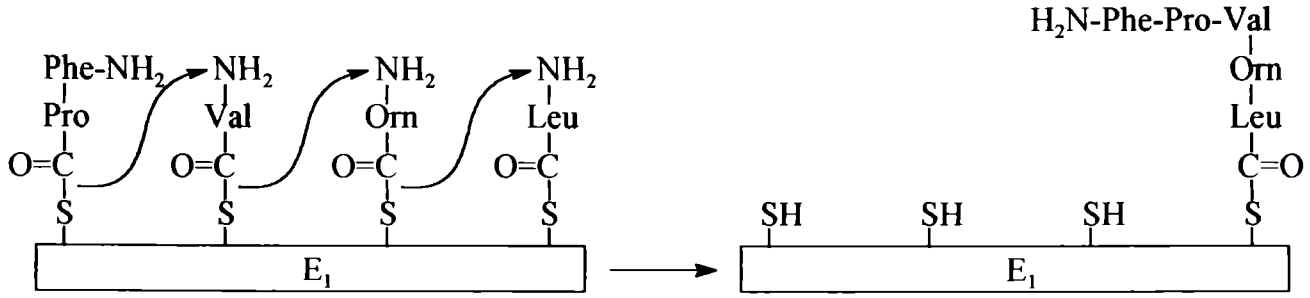
În prima etapă are loc formarea unui complex aminoacil-adenilat legat la enzimă, asemănător reacției aminoacil-t-ARN sintetazei. În a doua etapă, restul de aminoacid se leagă la enzimă printr-o legătură tioesterică.

Enzima E_1 leagă simultan resturile de L-Leu, L-Orn, L-Val şi L-Pro, iar enzima E_2 leagă numai restul D-Phe.

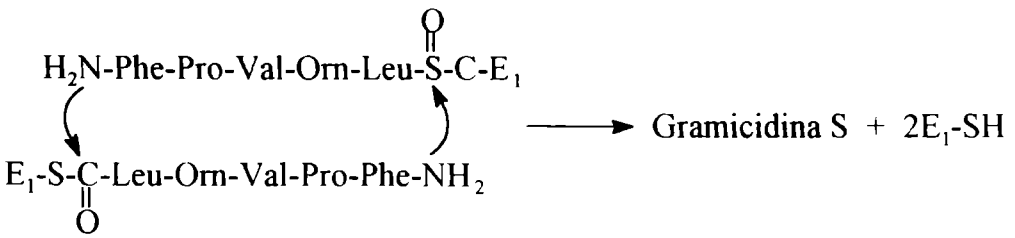
Procesul biosintetic începe printr-o interreacție între E_1 şi E_2, când se produce transferul D-fenilalaninei de la E_2 la gruparea imino a prolinei, unită cu E_1, formând o dipeptidă activată:



În continuare, creşterea catenei peptidice se produce printr-un transfer peptidic secvențial, pas cu pas, la aminoacizii legați în ordine pe enzimă, până la ultimul aminoacid, ajungând în final în situația:



Peptida legată de E_1 reacționează după principiul cap-coadă, cu o moleculă asemănătoare ei, asamblând decapeptida ciclică, gramicidina S.



Modul de aranjare al aminoacizilor din secvența gramicidinei S este determinat de aranjarea spațială şi de specificitatea enzimelor E_1 şi E_2. Este surpinzătoare specificitatea acestui complex enzimatic (şi a altora ca el) în recunoaşterea aminoacizilor şi fixarea lor în secvența peptidică, pe o cale mult diferită decât calea ribozomală de la biosinteza proteinelor.

În enzima E_1 trebuie să existe cel puțin o subunitate proteică, pentru fiecare legătură peptidică formată. Acest proces biosintetic este mult mai puțin economic decât cel ribozomal, motiv pentru care, probabil, se aplică până la pentadecapeptide.

Mecanismul său se aseamănă foarte mult cu mecanismul biosintezei acizilor graşi, în ambele situații fiind utilizați intermediari activați sub formă de tioesteri. Enzima E_1 conține un rest de fosfopanteteină legat covalent.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Purtătorul catenei peptidice în formare se presupune că este tiolul fosfopanteteinei, care o deplasează de la un loc la altul în enzima E_1, observându-se o funcție asemănătoare cu a grupei tiolice centrale a sistemului multienzimatic din cadrul biosintezei acizilor graşi.

Acest mod de biosinteză a fost dat pentru exemplificare pe gramicidina S, el intervenind asemănător şi pentru alte peptide cu acțiune antibiotică.

Din observațiile lui F. Lipman se poate constata că acest mecanism este primitiv, neevoluat, de sinteză a proteinelor din primele trepte ale evoluției, comparativ cu mecanismul de la nivelul ribozomal, care aparține unor trepte superioare ale evoluției.

Proprietățile antibiotice ale gramicidinei se manifestă printr-o acțiune bactericidă (distruge microbii) şi bacteriostatică (opreşte dezvoltarea microbilor). Decapeptida are o bună acțiune asupra cocilor Gram-pozitivi şi bacililor Gram-negativi.

Gramicidinele au o toxicitate accentuată şi nu se administrează parenteral. Se utilizează pentru tratamentul rănilor externe, în chirurgie, dizenterie, tratamente ginecologice etc. Gramicidina S a fost folosită în al doilea război mondial, pentru tratamentul extern al plăgilor. În tratamentul tuberculozei sunt utilizați derivați ai gramicidinei S cu acizii: nicotinic, salicilic, p-aminosalicilic ş.a., fiind netoxici.

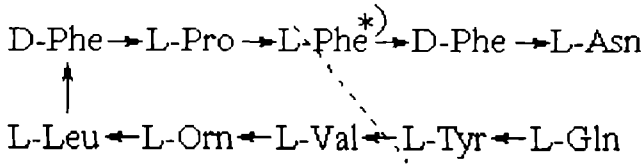
III.6.2.5.Tirocidine

Analog gramicidinelor, tirocidinele sunt peptide ciclice, cu acțiune antibiotică. Ele sunt produse de culturile unor tulpini de Bacillus brevis,în anumite condiții de creştere şi mediu de cultură.

Craig şi colaboratorii săi (1954) au reuşit să separe tirocidinele A, B şi C, prin metoda distribuției în contracurent. Primele două tirocidine sunt decapeptide ciclice, cu structură determinată. Membrii grupei tirocidinelor diferă între ei prin mărimea catenei peptidice, natura şi secvența resturilor de aminoacizi.

Cu toate deosebirile structurale ce apar în grupă, acțiunea antibiotică a tirocidinelor este asemănătoare. Aceasta constă într-o acțiune bactericidă şi bacteriostatică asupra bacteriilor Gram-pozitive (streptococi, stafilococi) şi mai puțin asupra bacteriilor Gram-negative.

Tirocidina A. Este o decapeptidă ciclică în care un segment peptidic se aseamănă cu una dintre jumătățile catenei din molecula gramicidnei S.



Tirocidina A

În structura tirocidinei A se constată prezența D-Phe şi a ornitinei (L-Orn), aminoacizi care nu apar în proteine şi în peptidele derivate din acestea.

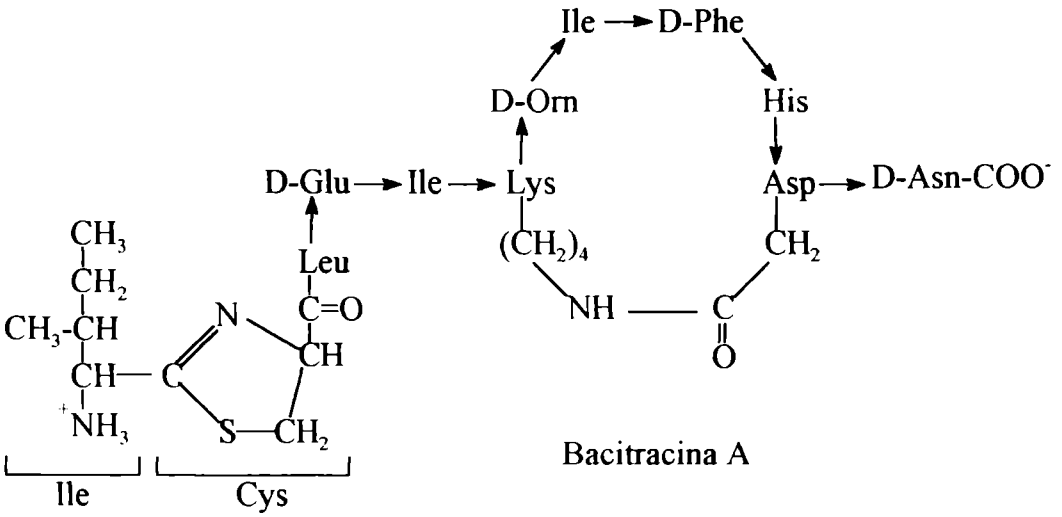
Tirocidina B are formulă asemănătoare tirocidinei A, numai că, aminoacidul notat L-Phe*) este înlocuit cu L-Trp.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Acțiunea antibiotică a tirocidinei A se manifestă prin producerea unor modificări profunde la nivelul membranelor celulare din microorganisme. Are un spectru larg de acțiune, însă din cauza toxicității mari, nu se administrează parenteral. Poate fi aplicată local pe plăgi infectate, arsuri, în oftalmologie, urologie sau în infecții intestinale (nu se absoarbe pe această cale).

III.6.2.6.Bacitracine

Bacitracinele sunt substanțe antibiotice cu structură ciclopeptidică, produse de Bacillus licheniformis. Au în moleculă o parte ciclopeptidică de care sunt ataşate catene laterale peptidice. Exemple de substanțe din această grupă sunt bacitracinele A, B şi C, dintre care reprezentativă, este bacitracina A:



Bacitracina A

În formulă, aminoacizii cu seria sterică neprecizată vor fi considerați din familia L.

Bacitracina A este o dodecapeptidă, formată dintr-un inel heptaciclopeptidic, de care sunt ataşate două catene laterale.

În molecula bacitracinei A intră atât D- cât şi L-aminoacizi. Masa ei moleculară este de 2,47KDa. Grupa -SH a cisteinei formează un inel tiazolic cu grupa carboxilică a izoleucinei adiacente. Acțiunea antibiotică a bacitracinei A constă în abilitatea sa de a inhiba biosinteza peretelui celular bacterian. Se utilizează în clinică, pentru că acționează distructiv asupra peretelui celulelor bacteriene şi nu afectează celulele animale, deoarece nu poate traversa membranele lor celulare.

Biosinteza peretelui bacterian este un proces extracelular, astfel că poate fi expusă cu uşurință acțiunii bacitracinei. Bacitracina are eficiență asupra bacteriilor Gram-pozitive (pneumococul , streptococul β-hemolitic, micrococul piogen şi unele clostridii), însă utilizarea ei este limitată din cauza unei toxicități renale.

Prin spectrul acțiunii antibiotice, bacitracinele se aseamănă cu penicilinele, dar au o activitate mai slabă ca acestea. Ele influențează însă creşterea activității penicilinelor şi a altor antibiotice ca streptomicina şi aureomicina.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Acțiunea antibiotică scade în grupa bacitracinelor, în ordinea: A>B>C şi s-a dovedit că toate aceste substanțe inhibă creşterea stafilococilor, la diluții foarte mari (1:40.0000 – 1:160.000).

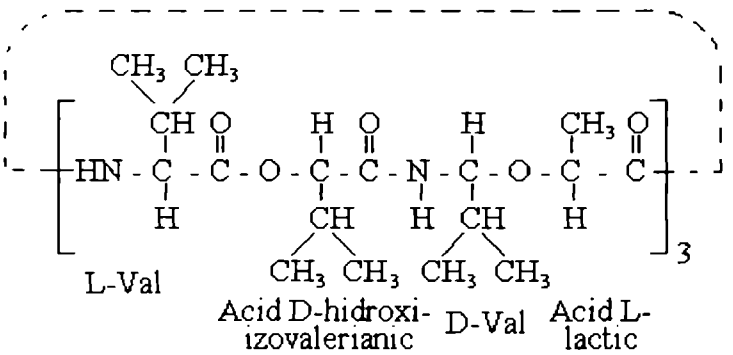
III.6.2.7.Depsipeptide

Grupa depsipeptidelor întruneşte o categorie aparte de substanțe cu acțiune antibiotică, de natură ciclopeptidică.

Depsipeptidele sunt sintetizate de ciupercile Fusarium şi Streptomyces. Catena lor inelară conține resturi de α-aminoacizi şi α-hidroxiacizi, asamblate prin legături de tip amidă şi ester. Ambele tipuri de substanțe de la care provin, aparțin seriilor L- şi D.

Se cunosc mai mulți compuşi din grupa depsipeptidelor, dintre care cel mai reprezentativ este valinomicina.

Valinomicina. A fost izolată din culturile de Streptomycines fulvissimus şi corespunde următoarei formule structurale:



Molecula valinomicinei are în componență 12 resturi de α-L-, α-D-aminoacizi şi D-hidroxiacizi, dispuşi în trei catene identice, legate cap la coadă, într-o alcătuire ciclică, simetrică.

Valinomicina face parte din categoria agenților ionofori, fapt care explică acțiunea sa antibiotică, prin împiedicarea fosforilării oxidative în mitocondriile celulelor bacteriene (vezi agenți ionofori).

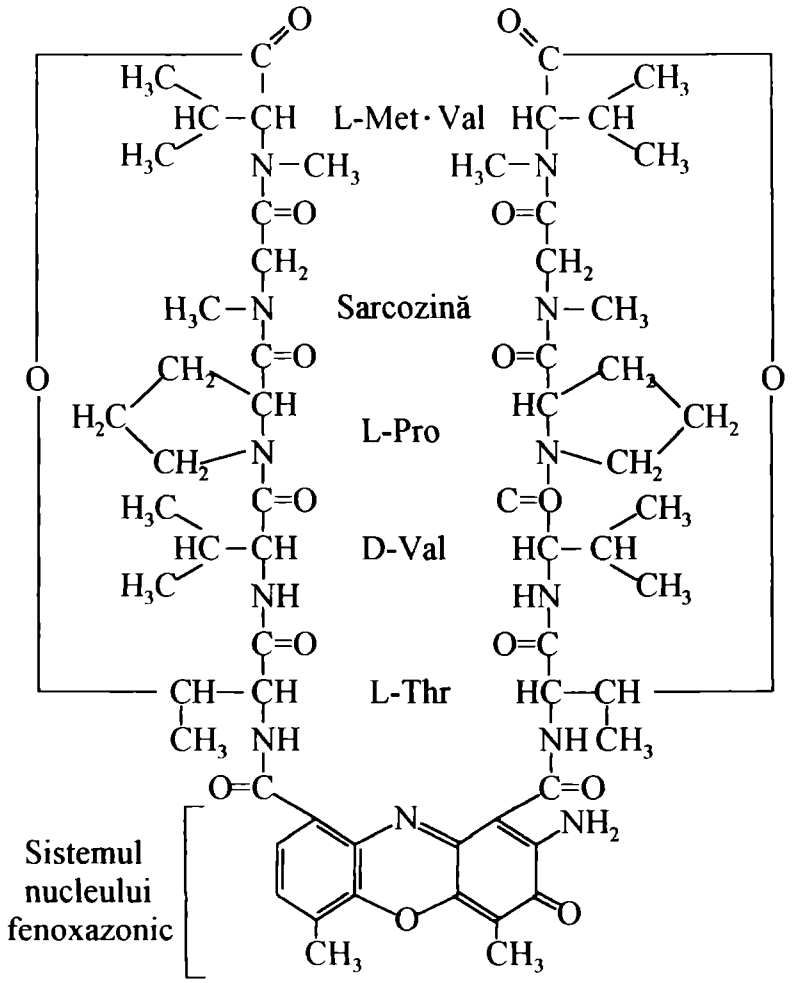
III.6.2.8.Actinomicine

Grupa actinomicinelor cuprinde peptide cu acțiune antibiotică, izolate din culturile de Streptomyces.

Actinomicina D. Un termen reprezentativ al grupei actinomicinelor este actinomicina D, numită şi meractinomicina sau actinomicina C_1, un antibiotic produs de Streptomyces antibioticus.

În afară de substituenții 2-amino şi 4,6-dimetil, pe nucleul fenoxazonic se mai află legate peptidic în pozițiile 1,9-, două catene ciclopeptidice identice şi simetrice. Structura acestor catene conține L-aminoacizi întâlniți în proteine, dar şi aminoacizi atipici (D-valina, L-metil-valina şi sarcozina).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Actinomicina D

În acțiunea antibiotică actinomicina D se manifestă ca un inhibitor potent al biosintezei acizilor nucleici şi implicit, a proteinelor. Aici, actinomicina D joacă rol de agent de intercalare care blochează funcția de matriță a ADN. În acest sens, actinomicina D se leagă la ADN, ciclul fenoxazonic intercalându-se între două perechi de baze G-C succesive de pe ADN bicatenar, iar catenele ciclopentapeptidice se leagă prin punți de hidrogen de resturile G şi se proiectează in canelura mare a ADN bicatenar.

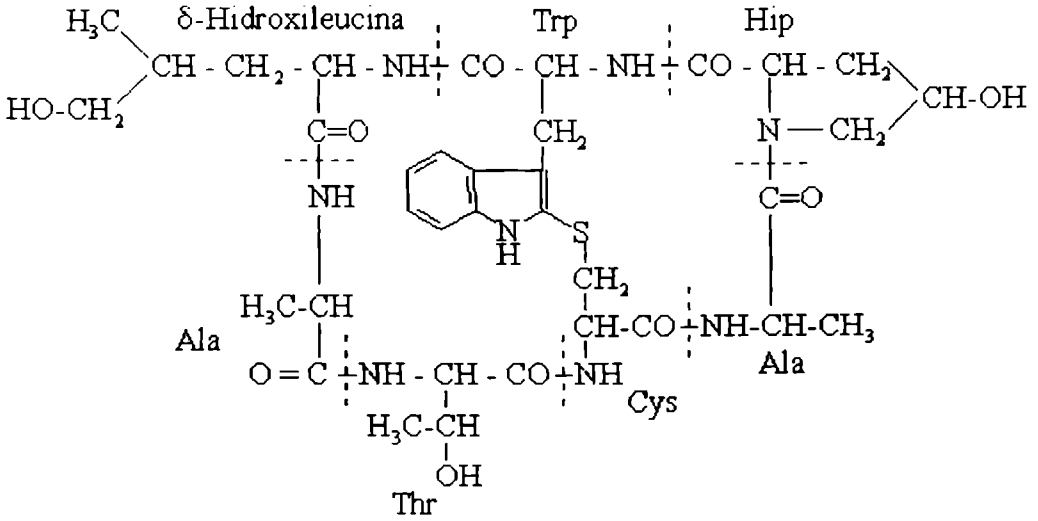
Astfel, actinomicina D blochează preferențial creşterea catenei ARN fără a avea însă vreun efect asupra legăturii ARN-polimerazei la ADN. Inhibă numai transcrierea m-ARN de către ARN polimerază şi prin aceasta şi biosinteza proteinelor, fără a afecta nici un alt proces metabolic.

Sinteza proteinelor mai poate fi blocată şi de alți inhibitori ca: puromicina, cicloheximida, cloramfenicolul, streptomicina, rampicina, aureomicina şi terramicina.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

III.6.2.9.Peptide toxice

A.Faloidina. Este o heptapeptidă biciclică izolată din ciuperca Amanita phalloides:



Faloidina

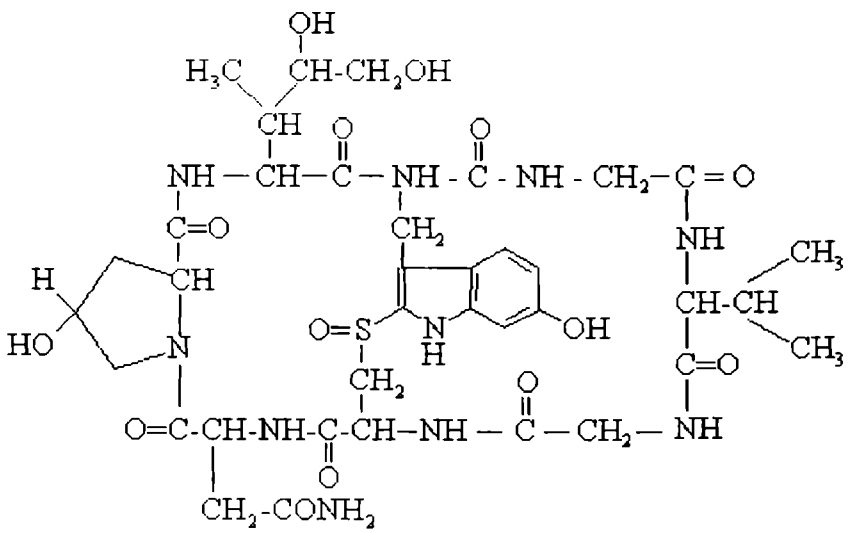
În structura moleculară, heptapeptida conține resturile aminoacizilor (sau derivați ai acestora): treonina, cisteina, L-hidroxitriptofan, alanina, δ-hidroxileucina și hidroxiprolina.

Faloidina este o substanță solidă, cristalină (ace din soluție apoasă), cu temperatura de topire de 280-282°C și masa moleculară 0,77KDa.

Caracteristică în structura faloidinei este legătura –C-S-, care ia naștere din grupa –SH a cisteinei și grupa –OH a 2-hidroxi-L-triptofanului, precum și resturile hidroxiprolinei și δ-hidroxileucinei.

Faloidina este un compus toxic care provine de la Amanita phalloides, o ciupercă cu un grad mare de toxicitate. Aceasta mai conține și α-amanitina, un inhibitor al ARN polimerazei.

B.α-Amanitina. Este o octapeptidă biciclică sintetizată tot de ciuperca Amanita phalloides, alături de phalloidină.



α-Amanitina

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Această ciclooctapeptidă este toxică, conține în structură anumiți aminoacizi neobișnuiți, mai rar întâlniți în alți compuși și se leagă foarte strâns de ARN polimeraza II.

α-Amanitina blochează în acest fel formarea precursorilor m-ARN, cât și etapa de alungire a catenei (elongare) în sinteza ARN.

III.6.2.10.Ionofori

Ionoforii sau agenții ionofori sunt substanțe organice de diverse tipuri, multe dintre ele antibiotice de origine bacteriană, capabile să inducă trecerea unor ioni specifici prin membranele biologice. Primele substanțe având aceste proprietăți au fost valinomicina și gramicidina A, respectiv câte una dintre cele două tipuri de agenți ionofori: agenți ionofori purtători și agenți ionofori sunb formă de canale.

Funcțiile îndeplinite de aceștia sunt asemănătoare, diferind însă prin mecanismul procesului de transport al respectivilor ioni prin stratul dublu lipidic al membranelor celulare.

A.Ionofori purtători. Prima substanță mai reprezentativă din această grupă este valinomicina. Structura ei, ca și a multor alți ionofori, este inelară (III.6.2.7) având partea exterioară hidrofobă și cea interioară hidrofilă.

În partea interioară se leagă coordinativ ionul specific transportat de valinomicină, K^+, formând complexul valinomicină-K^+, care prin exteriorul său hidrofob traversează mai cu ușurință membrana celulară, cu strat lipidic dublu.

În mod normal, ionii K^+ liberi traversează greu membrana celulară hidrofobă, însă prinși în complexul valinomicină- K^+, intensifică transportul lor prin membrană.

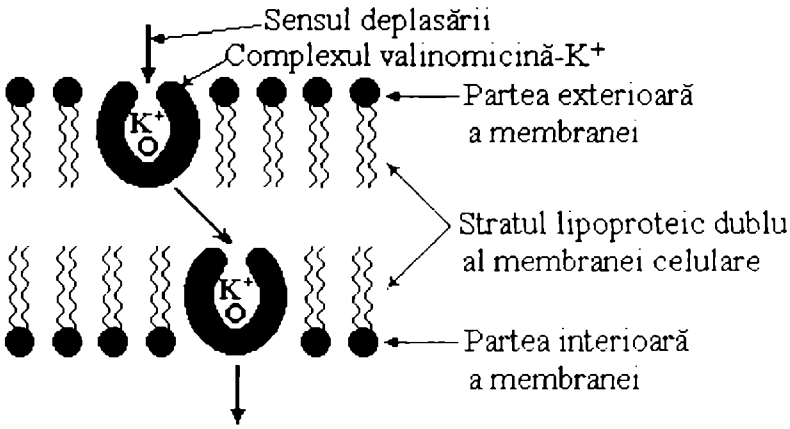


Fig.III.5 – Modul de transport al ionoforilor purtători

Totuși, acest transport necesită un consum de energie. Dacă ne referim la membrana mitocondrială din bacterii, putem deduce că pentru traversarea ei de către un mare număr de complecși valinomicină-K^+, se cheltuiește o mare parte din energia mitocondriei, necesară fosforilării oxidative. Fosforilarea oxidativă în celula bacteriană este serios afectată și microorganismul patogen moare, evidențiindu-se prin aceasta acțiunea bactericidă a valinomicinei.

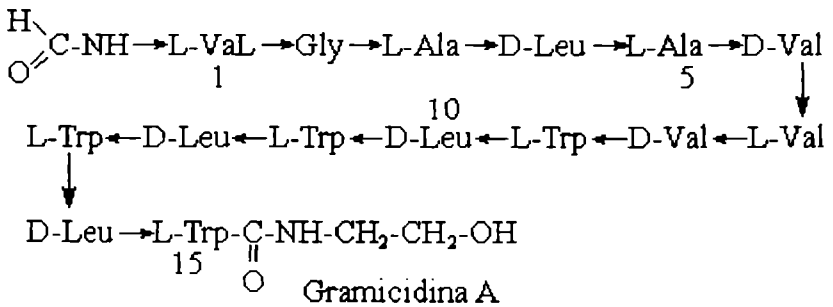
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

După eliberarea ionului K^+ în mediul celular, moleculele de valinomicină traversează în sens invers membrana mitocondrială, ieşind la suprafaţă şi pregătindu-se pentru un nou transport de ioni K^+.

Asemănător valinomicinei acţionează şi alţi ionofori ca: nigericina, nonactina etc.

În cazul nigericinei, ionofor specific pentru K^+, care spre deosebire de valinomicină are o sarcină negativă, complexul nigericină-K^+ nu are sarcină electrică. Acest antibiotic stimulează schimbul K^+ cu H^+, în timp ce valinomicina stimulează numai trecerea K^+.

B.Agenţi ionofori sub formă de canale. Aceşti ionofori pot constitui canale transmembranare sau pori, prin care difuzează ionii specifici, selectaţi de ei. Molecula lor este liniară şi ajunge la astfel de structuri prin spiralare. Primul şi cel mai caracteristic ionofor de acest tip este gramicidina A.



Gramicidina A

Gramicidina A este o pentadecapeptidă cu catena deschisă, având grupele N- şi C-terminale blocate. In secvenţă, resturile de aminoacizi alternează prin seriile D şi L. Catena este răsucită β-helix, aceasta fiind posibil datorită altenanţei configuraţiilor D şi L a resturilor de aminoacizi, permiţând succesiv grupelor –NH şi >C=O să fie aranjate în sens opus, pentru a forma legături de hidrogen. Două astfel de molecule se asociază cap la cap, prin resturile lor formil N-terminale, între care se stabileşte o legătură de hidrogen, alcătuind un dimer.

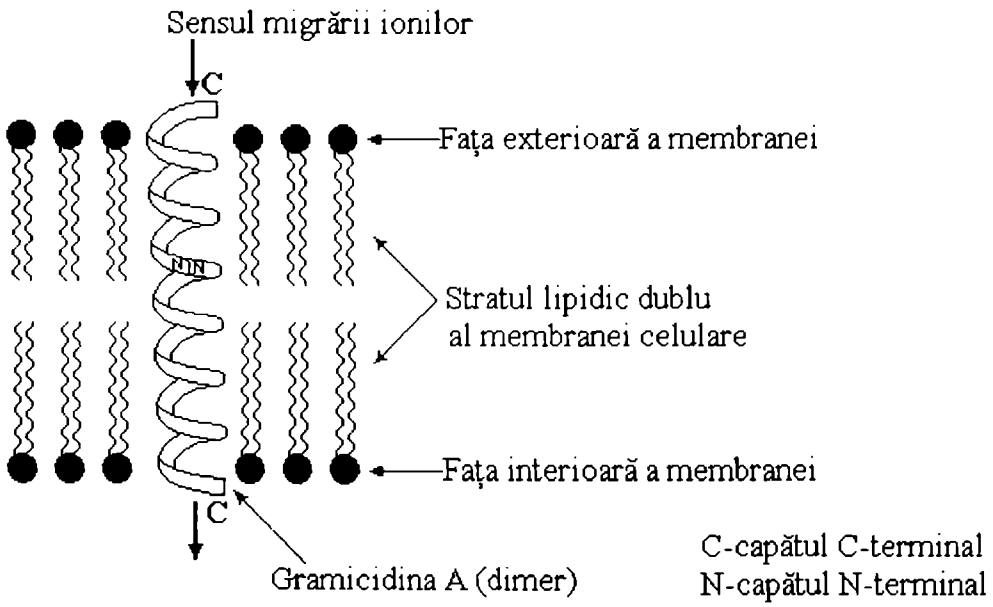


Fig.III.6 – Modul de transport al ionoforilor

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Grupele nepolare, hidrofobe sunt orientate în afara helixului, iar cele hidrofile, spre interior. Dimerul având exteriorul hidrofob, va penetra cu uşurinţă membrana lipidică dublă, rămânând intercalat între moleculele lipidice ca un por.

Acest aranjament, cu interiorul porului hidrofil având diametrul de 0,4nm, asigură trecerea ionilor metalelor alcaline prin membranele bacteriene.

Spre deosebire de valinomicină, care are un grad mare de specificitate pentru inducerea transportului de K^+, gramicidina A are o specificitate mai slabă, inducând transportul ionilor K^+, Na^+ şi al altor cationi monovalenţi prin membrana mitocondriilor, eritrocitelor şi prin straturile duble de fosfolipide sintetice (raze ionice: Li^+, r=0,60nm; Na^+, r=0,95nm; K^+; r=1,33nm; Rb^+, r=1,49nm).

După transportul prin difuzie al ionilor prin membrana dublu lipidică, mediat de ionofori, ionoforii sub formă de canal nu părăsesc membrana precum ionoforii purtători, ci servesc în continuare trecerii de ioni.

Există şi ionofori foarte activi în inducerea transportului ionilor bivalenti, în special Ca^{2+}.

În afara efectelor caracteristice asupra inducerii transportului de ioni prin membrana mitocondrială şi a fosforilării oxidative, ionoforii au mai fost studiaţi şi ca instrumente pentru analiza experimentală a funcţiei de transportori de ioni în inimă şi rinichi.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

IV. PROTEINE

IV.1. Generalităţi

Proteinele sunt compuşi naturali, macromoleculari, care iau naştere prin policondensarea moleculelor de aminoacizi, cu eliminare de apă. Aceste substanţe se produc în celulele tuturor organismelor vii. Biosinteza lor are loc sub control genetic, în concordanţă cu cerinţele structurale şi funcţionale proprii acestor organisme, pe tot parcursul vieţii.

Proteinele sunt componente de prim ordin în organizarea şi structurarea materiei vii, la nivel subcelular, celular, ţesut, organ şi, integrativ, la nivelul global al organismului.

Locul proteinelor în această organizare este strict corelat cu funcţia şi rolul biologic de îndeplinit. Proprietăţile şi funcţiile biologice sunt strâns legate de caracteristicile structurale ale diverselor tipuri de proteine şi chiar a fiecărei proteină în parte.

Conţinutul în proteine variază de la o specie la alta, de la organ la organ, de la ţesut la ţesut, astfel că în diverse organe şi ţesuturi, conţinutul procentual raportat la proteinele întregului organism variază între 0,1% (în dinţi) şi 34,7% (în muşchi).

În compoziţia chimică a proteinelor se găsesc, fără excepţie, elementele C, H, O şi N. Pe lângă acestea, apar de multe ori S şi P, iar cu o frecvenţă mult mai redusă, Fe, Cu, Ca, Mg, Mn şi altele.

Conţinutul procentual al elementelor chimice din proteine variază mult, cu natura lor. Diferenţele sunt însă mici, pentru acelaşi element, aşa cum se observă din următoarele exemple: C (50-52%), H (6,8-7,7%), O (20,9-23,5%), N (15-20%), dar în majoritatea cazurilor este de 16-17%), S (0-2%) şi P (0-1%).

Diversitatea funcţională este în dependenţă directă de marea varietate structurală a proteinelor, în esenţă, de structura primară şi de conformaţia lor. De aceea, interpretarea oricăror proprietăţi sau funcţii biologice la proteine trebuie corelată cu structura lor de ansamblu.

IV.2. Structura proteinelor

Elucidarea structurii proteinelor a constituit o problemă dificilă de cercetare, de lungă durată, datorită marii diversităţi a compuşilor din această clasă şi, mai cu seamă, a înaltului grad de complexitate a arhitecturii lor moleculare. Sub acest aspect, proteinele şi acizii nucleici se deosebesc de toate celelalte substanţe din natură.

Catenele macromoleculelor proteice sunt formate din resturi de aminoacizi, unite între ele prin legături peptidice.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Dintre cei peste 200 aminoacizi întâlniți în natură, numai 20 intră, în mod curent, în structura proteinelor naturale. Aceştia sunt α-aminoacizi şi cu excepția glicinei, fac parte din familia (seria) sterică L.

Delimitarea proteinelor de polipeptide este oarecum arbitrară. Unii autori consideră proteinele compuşi polipeptidici cu mase moleculare începând de la 5KDa, însă alții şi cei mai mulți, opinează pentru valori de peste 10KDa.

Prin creşterea lanțurilor polipeptidice şi, implicit, a gradului de complexitate, apar nivele de organizare structurală superioare, cu proprietăți noi, neîntâlnite la polipeptidele inferioare. Aceasta, datorită faptului că prin interacțiile ce se stabilesc intracatenar între grupările peptidice sau între diferiții radicali ai resturilor de aminoacizi, lanțul polipeptidic adoptă o anumită orientare spațială. Între astfel de catene polipeptidice pot interveni, de asemenea, interacții de natură intercatenară, ducând la formarea unor agregate macromoleculare multicatenare.

Cercetarea unor astfel de structuri produse ca rezultat al tuturor interacțiilor intra- şi intercatenare, covalente şi necovalente, între resturile de aminoacizi care prin numărul, natura şi ordinea aranjării lor în moleculă crează o mare diversitate structurală, este dificilă sau chiar imposibilă, fără o abordare sistematică.

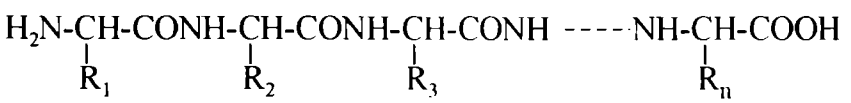
În acest context, se consideră pentru proteine patru nivele de organizare structurală, respectiv structurile: primară, secundară, terțiară şi cuaternară. Această delimitare pe nivele de organizare structurală vizează în primul rând aspectul metodologic. În realitate, o separare netă între ele este greu de realizat, avându-se în vedere coexistența interacțiilor, întrepătrunderea şi intercondiționarea lor permanentă, în cadrul structurii proteice globale.

De reținut că, ultimele trei nivele de organizare structurală (secundară, terțiară şi cuaternară) reprezintă structura conformațională a proteinelor.

IV.2.1. Structura primară

Proteinele fiind formate din catene polipeptidice foarte lungi, au unele caracteristici structurale comune peptidelor şi polipeptidelor.

Structura primară constă în organizarea intracatenară a resturilor de aminoacizi, determinată de natura, numărul şi secvența acestor resturi în catena proteică.



În această dispunere, natura aminoacizilor se referă la felul aminoacizilor individuali participanți în structură, numărul lor, precizează de câte ori (sau în ce proporție) aceştia apar în moleculă, iar secvența arată succesiunea (ordinea) resturilor de aminoacizi din structura monodimensională (liniară) a macromoleculelor proteice.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Cercetând cu atenție formula de mai sus, se constată că pe o catenă de bază apare repetitiv, de la o extremitate la alta, grupul de atomi $-NH-\underset{|}{C}H-CO-$, într-o alcătuire monotonă.

În contrast cu aceasta, diversitatea moleculară a numărului impresionant de proteine din materia vie ($\sim 10^{10}$-10^{12}), este conferită de radicalii R legați la atomii C_α ai celor 20 aminoacizi "standard" întâlniți în astfel de compuși.

Asemănător peptidelor și polipeptidelor, se întâlnesc la catenele proteice grupe amino- și carboxil-terminale și respectiv, aminoacizi N- și C-terminali, reprezentați după aceleași reguli. Resturile aminoacizilor sunt ordonate într-o anumită secvență caracteristică fiecărei proteine individuale, selectată și realizată sub control genetic.

Structura primară implică în totalitatea ei numai legături covalente, fapt pentru care mai este denumită și structura covalentă.

Caracteristică în lanțul macromolecular proteic este grupa peptidică –CONH–, care rezultă din asamblarea cap la coadă a resturilor de aminoacizi componenți. Structura grupei peptidice, valabilă și aici, este cea prezentată și discutată la paragraful III.3.

Planeitatea grupelor peptidice și posibilitatea rotirii libere a atomilor de carbon din pozițiile α sunt elemente de prim ordin, care imprimă lantului polipeptidic aranjamentul transoid, cel mai stabil din punct de vedere energetic.

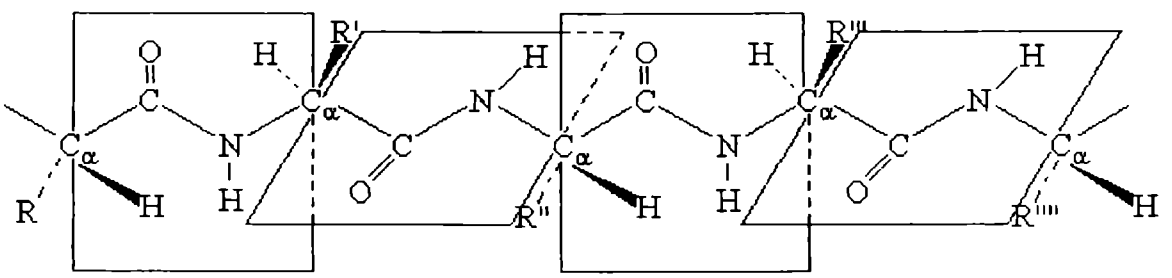


Fig.IV.1 – Fragment dintr-o catenă proteică (peptidică sau polipeptidică)

În acest aranjament, radicalii R atașați atomilor C_α sunt dispuși alternativ, deasupra și dedesubtul planului legăturii peptidice, de-a lungul întregii catene.

Într-un aranjament transoid, se găsesc și atomii O și H ai grupelor peptidice. În figură apare clară și dispunerea in zig-zag a atomilor implicați direct, în formarea lanțului peptidic.

Toate aceste elemente structurale prin care se crează o anumită flexibilitate a lanțurilor proteice, precum și configurația L a resturilor de aminoacizi, sunt factorii de bază pe care se întemeiază celelalte nivele de organizare structurală, atribuind structurii primare, pe drept cuvânt, însușirea de "coloană vertebrală" a macromoleculelor proteice.

Toate moleculele aceleiași proteine au aceeași secvență de aminoacizi. Secvența proteinelor naturale și a peptidelor derivate din ele este stabilită genetic, având deci caracter ereditar.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Modificări structurale în secvența aminoacizilor pot apărea, fie prin procese de denaturare, când sunt transformate anumite grupe funcționale din radicalii R (ex.: $-NH_2 + HNO_2 \rightarrow -OH + N_2 + H_2O$), fie prin mutații genetice, care au drept consecință biosinteza unor proteine modificate structural față de cele normale, sintetizate înainte ca mutația să aibă loc.

IV.2.2. Structura secundară

Prin structură secundară se înțelege un aranjament spațial ordonat al lanțului macromolecular proteic de-a lungul unei dimensiuni.

Relativa flexibilitate a catenelor proteice, condiționată de caracteristicile structurii primare, permite ca prin interacțiile grupelor peptidice intra- şi intercatenare, lanțul macromolecular să adopte un aranjament spațial definit. Aceste interacții se concretizează în formarea legăturilor de hidrogen între grupele >NH şi >C=O, aparținând unor grupe peptidice diferite, situate avantajos din punct de vedere steric.

$$\rangle N - H \cdots O = C\langle$$

Legăturile de hidrogen sunt slabe, însă prin numărul lor mare şi distribuția uniformă de-a lungul întregului aranjament, se stabilizează şi se consolidează edificiul structurii secundare.

În această situație, radicalii R grefați pe atomii C_α adiacenți grupelor peptidice îşi mentin aranjamentul transoid, impus de cerințele sterice şi energetice ale moleculei.

Pauling şi Corey (Premiul Nobel în 1954) au postulat mai multe modele pentru structura secundară a proteinelor, în care poate fi atinsă stabilitatea maximă, prin formarea unui număr maxim de legături de hidrogen şi anume: modelul α-helix, modelul cu planuri pliate (sau foaie pliată) şi modelul de tip colagen.

IV.2.2.1. Modelul α-helix

Potrivit modelului α-helix, catenele polipeptidice lungi sunt răsucite în formă de spirală, în jurul unui ax central imaginar. Modul de spiralare poate fi spre dreapta sau spre stânga, constituindu-se structurile α-helix de dreapta şi α-helix de stânga.

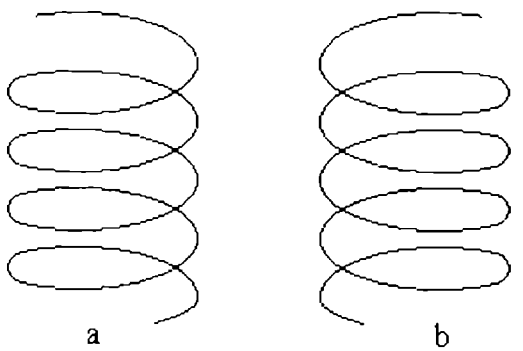


Fig.IV.2 – Modelul α-helix:
a) - α-helix de dreapta; b) - α-helix de stânga

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Din L-aminoacizii întâlniți în natură se pot forma catene proteice cu răsucire în spirală de dreapta sau de stânga, însă α-helixul de dreapta fiind mai stabil, este prioritar. α-Helixul de stânga este favorabil proteinelor sintetice formate din D-aminoacizi. Prin urmare, o structură α-helix este formată numai din L-aminoacizi sau numai din D-aminoacizi, dar niciodată din D- şi L-aminoacizi împreună, în acelaşi lanț proteic.

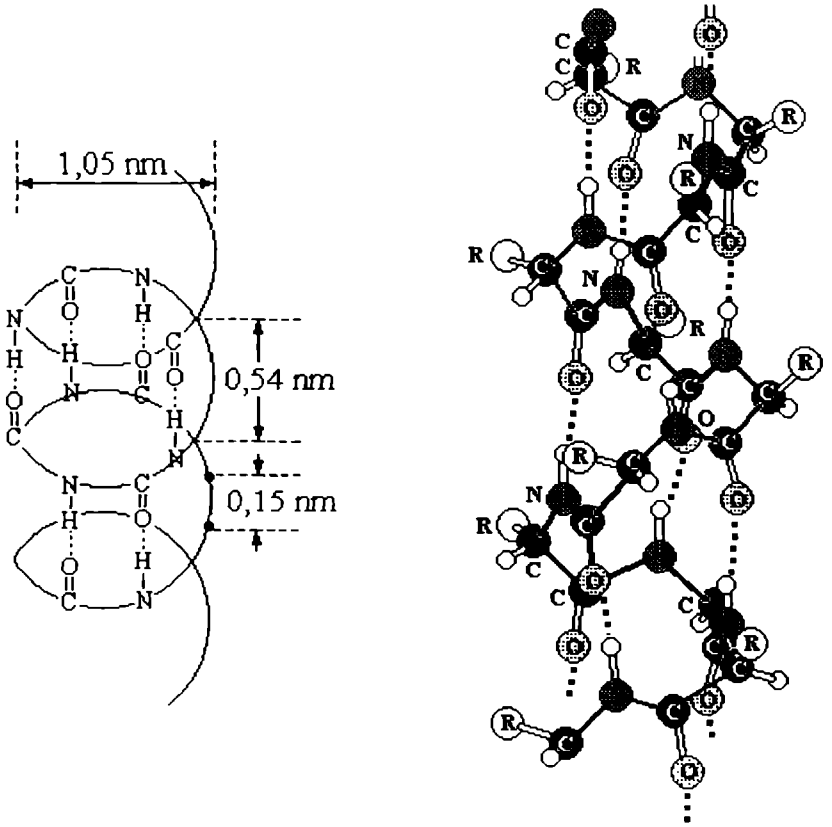


Fig..IV.3 – Structură secundară (α-helix de dreapta)

Un α-helix format din resturi de α-D-aminoacizi apare ca imaginea în oglindă a helixului rezultat din α-L-aminoacizi.

Dovada concretă a existentei structurii α-helix de dreapta în proteinele naturale a fost adusă de Pauling şi Corey, pe baza spectrelor de difracție a razelor X, efectuate asupra α-keratinei, o proteină fibrilară din lână şi păr, a cărei structură secundară este formată numai din α-helix regulat (fig.IV.3).

Prin calcule şi interpretări corecte, Paulimg şi Corey au ajuns la următoarele concluzii:

-în α-keratină şi alte proteine naturale, structura secundară corespunde modelului α-helix de dreapta, format din α-L-aminoacizi, asemănător unei scări în spirală, în care fiecărei trepte îi corespunde un rest de aminoacid;

-o spiră completă conține 3,6 resturi de aminoacizi;

-distanța dintre două spire (pasul) este de 0,54nm;

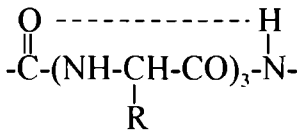
-înălțimea cu care contribuie fiecare rest de aminoacid la lungimea α-helixului pe direcția axului central, este de 0,15nm (din relația: 0,54:3,6=0,15);

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

-într-un set de 5 spire complete, în care sunt cuprinse 18 resturi de aminoacizi (5x3,6=18), se întâlneşte un rest de aminoacid exact în aceeaşi poziţie cu primul (luat ca punct de referinţă), adică după 2,7nm. Aceasta se numeşte "perioada de identitate" şi rezultă din calculul: 18x0,15=2,7;

-diametrul unei spire este de 1,05nm;

-grupele >C=O şi >N-H din două grupe peptidice situate avantajos din punct de vedere steric pe două spire vecine (la o distanţă de trei secvenţe între ele), formează legături de hidrogen paralele cu axul longitudinal central al helixului:



Legăturile de hidrogen sunt slabe, însă prin numărul mare şi distribuţia lor uniformă, contribuie la consolidarea structurii α-helix. Stabilitatea α-helixului se realizează printr-un efect cumulativ al energiei tuturor legăturilor de hidrogen intracatenare pe care le conţine;

-radicalii R legaţi la C_α din resturile de aminoacizi ocupă poziţii alternative, de o parte şi de alta a planurilor peptidice şi sunt orientaţi radial, spre exteriorul α-helixului.

Lanţul proteic principal rezultat prin unirea cap-coadă de un număr mare de ori a segmentului -NH-CH-CO- , formează interiorul α-helixului, iar radicalii R orientaţi radial în afara lui, alcătuiesc o zonă exterioară, elicoidală.

α-Helixul monocatenar, care apare sub forma unor bastoane scurte, cu lungimea sub 4nm, este mai frecvent şi poate fi întâlnit în structuri mai lungi, chiar şi peste 100nm.

α-Keratinele din păr şi lână conţin şapte, respectiv trei astfel de helixuri (fibre), răsucite împreună în aceste formaţiuni ca în nişte frânghii, în care fibrele sunt asociate strâns între ele, prin legături disulfurice (modele superelicoidale) (fig.IV.4).

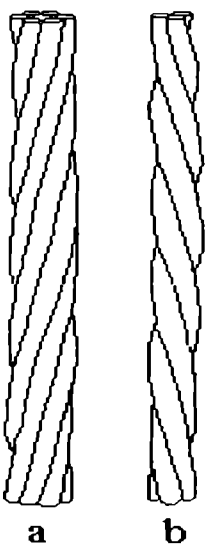
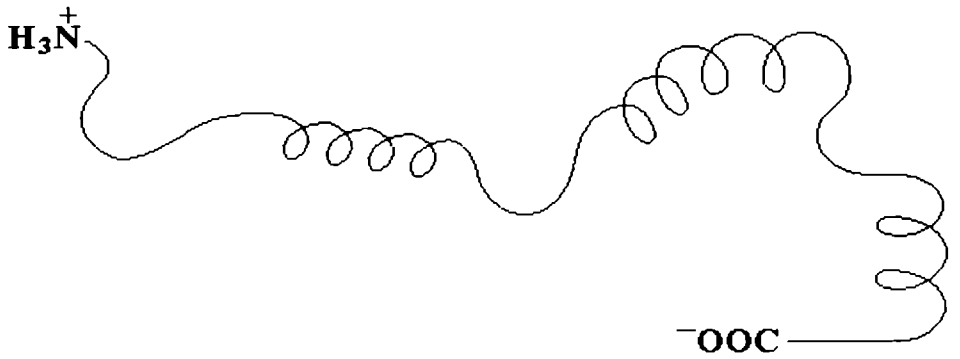


Fig.IV.4 – Modele superelicoidale ale keratinelor din păr (a) şi lână (b)

În astfel de structuri asociate mai pot apărea, de exemplu şi epidermina din piele, miozina şi tropomiozina din muşchi şi fibrina din cheagul de sânge, cu rol important în proprietăţile fizico-mecanice ale proteinelor.

Totuşi, proteine ale căror catene polipeptidice se află într-un procent maxim de spiralare sunt puţine la număr. În majoritatea cazurilor, catenele polipeptidice din proteine conţin porţiuni spiralate, care alternează cu segmente nespiralate, dezorganizate.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



În tabelul IV.1 este prezentată proporția de α-helix în unele proteine.

Tabelul IV.1 – Conținutul în α-helix al unor proteine *)

Proteina	% α-helix
Chimotripsina	15
Ribonucleaza	16
Ovalbumina	31
Pepsina	31
Insulina	38
Serumalbumina de bovină	46
Mioglobina	70

*)Evaluările au fost efectuate prin metoda dispersiei activității optice.

Segmentele nespiralate apar ca discontinuități într-un aranjament molecular ordonat. Ele sunt determinate de prezența unor resturi de aminoacizi helix deformatori sau helix destabilizatori, în secvența lanturilor proteice respective.

Tabelul IV.2 – Aminoacizi formatori, destabilizatori şi deformatori ai α-helixului

Aminoacizi formatori	Aminoacizi destabilizatori	Aminoacizi deformatori
α-Alanina	Serina	Prolina
Leucina	Izoleucina	Hidroxiprolina
Fenilalanina	Treonina	
Tirozina	Acid glutamic	
Triptofanul	Acid aspartic	
Cisteina	Lisina	
Metionina	Arginina	
Histidina	Glicina	
Asparagina		
Glutamina		
Valina		

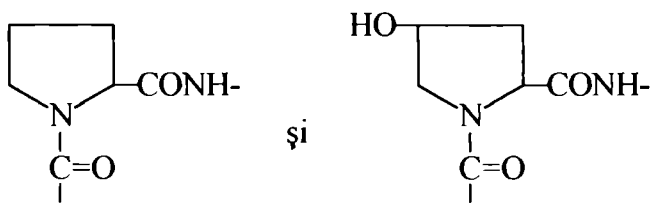
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Astfel de structuri sunt caracteristice proteinelor globulare, gradul de spiralare variind de la o proteină la alta.

Cunoscând compoziția în aminoacizi, pe baza datelor din tabelul IV.2, se pot face aprecieri asupra formei structurale adoptate de proteine. Aceasta, avându-se în vedere că pentru grupele R voluminoase, legate la atomii C_α, este preferată forma α-helix, respectivele grupe putându-se orienta, fără restricție, spre exteriorul edificiului elicoidal.

α-Helixul este instabilizat de aminoacizi cu radicalul R foarte mic, cum este glicina, de aminoacizi încărcați electric (în forma disociată la pH=7), ca acizii aspartic şi glutamic, având sarcini negative şi lisina, încărcată pozitiv. Sarcinile de acelaşi fel se resping, iar radicalii R foarte mici nu au un efect steric suficient pentru formarea α-helixului. Toate acestea devin factori destabilizatori ai structurii α-helix, favorizând formarea acelor segmente despiralate, dezorganizate (randomizate). În plus, la lărgirea acestui proces mai pot contribui mărimea sau ansamblul radicalilor R. Este cazul, spre exemplu, al izoleucinei, datorită unei împiedicări sterice a grupei sale R de la atomul C_α.

Prolina şi hidroxiprolina sunt doi aminoacizi α-helix deformatori. Ei pot fi incluşi într-un lanț peptidic, prin grupele peptidice care conțin atomul de azot din ciclul pirolidinic şi grupa carboxil din poziția 2, dar împiedică formarea structurii α-helix.



În formulele de mai sus se observă că atât atomii C_α cât şi atomii de azot legați de ei, fac parte din ciclul pirolidinic rigid, care nu permite rotația liberă a legăturilor N-C din ciclu şi nici a legăturilor C-N peptidice. În plus, grupa NH din ciclu fiind blocată, nu poate participa la formarea legăturilor de hidrogen intracatenare, specifice structurii α-helix. Din această cauză, când într-un lanț polipeptidic se află prolina sau hidroxiprolina, formarea α-helixului se întrerupe.

IV.2.2.2. Modelul în "planuri pliate" (foaie pliată sau conformația β)

Pentru structura secundară a proteinelor, Pauling şi Corey au mai postulat în 1951 şi modelul în "planuri pliate", un aranjament ordonat, stabilizat printr-un număr mare de legături de hidrogen intercatenare.

Planeitatea grupelor peptidice şi posibilitatea rotirii atomilor C_α în jurul legăturilor simple, permit contorsionarea catenelor polipeptidice în diverse planuri. Mai multe astfel de catene se asociază într-un aranjament paralel (orientare catenară în acelaşi sens) sau antiparalel (orientare catenară inversă), prin legături de hidrogen intercatenare, ce se stabilesc între grupele >CO şi >NH din funcțiunile peptidice existente în structura lor.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

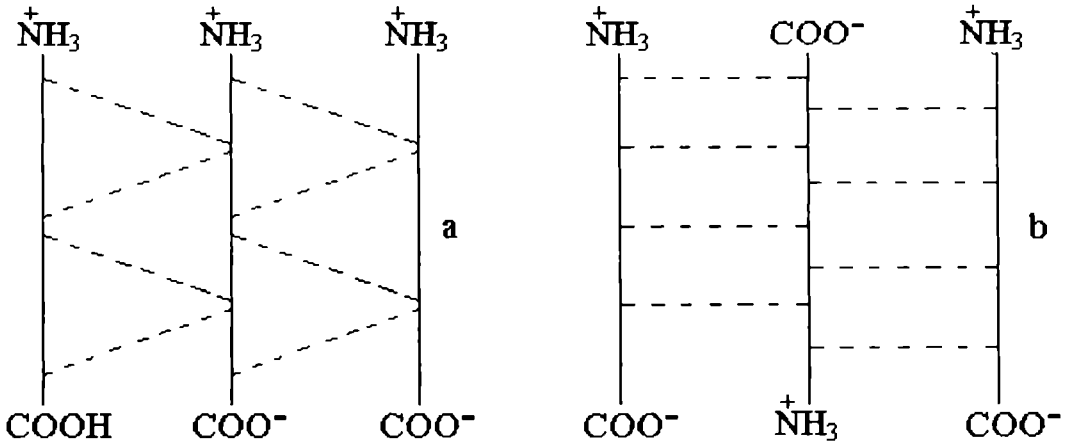


Fig.IV.5 – Aranjamentul catenelor proteice în modelul "Planuri Pliate"
a)Aranjament paralel (β-Keratina); b)Aranjament antiparalel (Fibroina)

În modelul foaie pliată, fiecare grupă peptidică este angajată în două legături de hidrogen, cu două grupe peptidice din alte catene polipeptidice învecinate. La această legare încrucişată, intercatenară, participă toate legăturile peptidice, conferind structurii o mare stabilitate.

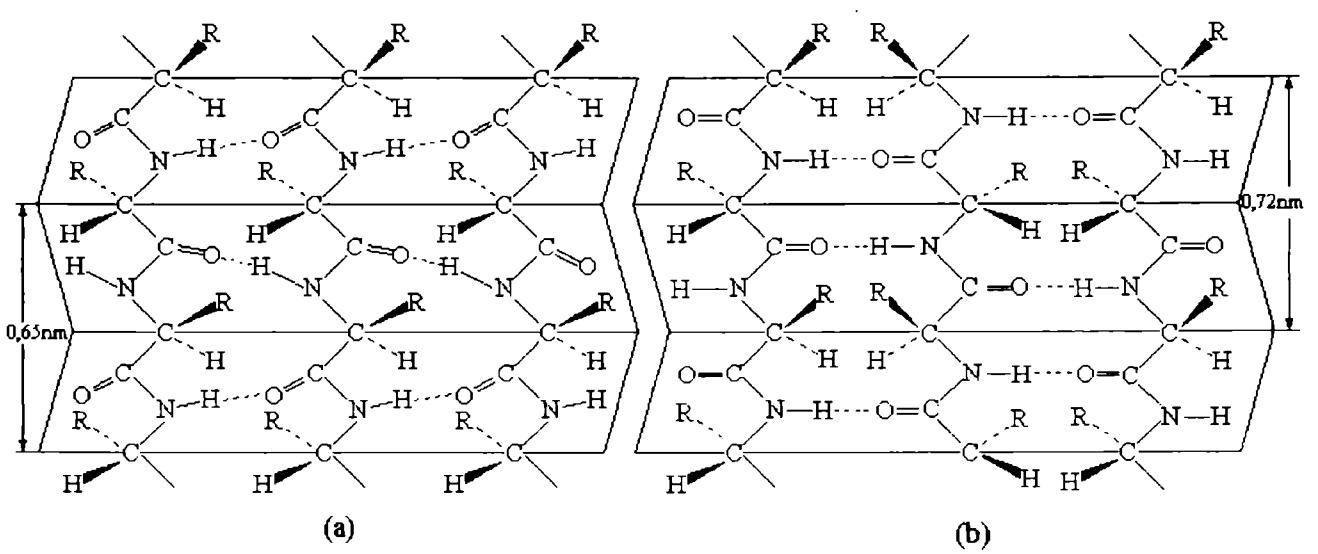


Fig.IV.6 – Modelul în planuri pliate:
a)Orientare paralelă (β-Keratina); b)Orientare antiparalelă (Fibroina)

Se constituie astfel, planul grupelor peptidice. La intersecția lor se formează muchiile, pe care se află atomii C_α, ai căror radicali R sunt orientați deasupra şi dedesubtul planurilor, într-o dispunere "trans" repetitivă, în zig-zag de-a lungul axului catenar longitudinal. În aceste aranjamente spațiale, legăturile de hidrogen sunt aproape perpendiculare pe axa catenelor polipeptidice. Exemple specifice pentru modelul în planuri pliate sunt β-keratina, o proteină din lână şi păr, corespunzând modelului cu orientare paralelă şi fibroina, din mătasea naturală, având catenele orientate antiparalel.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Modelul în planuri pliate se caracterizează printr-o conformație destinsă, comparativ cu modelul α-helix. În cadrul acestui model, aranjamentul antiparalel (b) tipic fibroinei (o proteină secretată de viermele de mătase Bombix-mori) este cel mai extins, având unghiul diedru şi perioada de identitate 0,72nm, mai mare decât aranjamentul paralel (a), caracteristic β-keratinei (perioada de identitate=0,65nm).

Proiecția distanței dintre doi aminoacizi pe direcția axei lungi este de 0,35nm, față de α-helix, care are 0,15nm. Un alt aspect, care diferențiază cele două modele, se referă la legăturile de hidrogen. În timp ce la modelul α-helix legăturile de hidrogen sunt intracatenare şi paralele cu axa centrală longitudinală, la modelul foaie pliată aceste legături sunt intercatenare şi perpendiculare sau aproape perpendiculare pe axa centrală longitudinală a edificiului structural.

Valorile diferite dintre unghiuirile diedre şi perioadele de identitate apar ca nişte consecințe ale interacțiilor dintre radicalii R, determinate de dispunerea lor reciprocă în spațiu.

În timp ce la aranjamentul paralel radicalii R sunt dirijați în direcții paralele, ordonate în spațiu, în aranjamentul antiparalel dispunerea radicalilor nu mai este paralelă, distanțele dintre ei fiind valoric mai mici. Distanțele interatomice mai mici condiționează interacții mai mari, obligând aranjamentul să adopte o conformație mai destinsă.

β-Keratinele sunt proteine bogate în aminoacizi care au radicalii R relativ mici, preponderente fiind glicina şi α-alanina. La fibroină, în cele mai multe tipuri, fiecare al doilea aminoacid este glicina, prin urmare, grupele R de pe o parte a foii pliate sunt atomi de hidrogen. De cealaltă parte se află radicalii metil al resturilor de alanină, al doilea aminoacid deținut în cantitate mare în fibroină. Radicalii R voluminoşi sau încărcați cu sarcini de acelaşi fel, prin interacțiile sterice sau electrostatice care intervin, împiedică formarea structurilor foaie pliată, favorizând modelul α-helix.

Aceste date stau la baza interpretării unui fenomen observat în practică: ținută la căldură şi umezeală, α-keratina din lână se poate întinde până la o lungime dublă. Explicația constă în faptul că în aceste condiții legăturile de hidrogen intracatenare din α-helixul de dreapta, compact, al α-keratinei se rup, favorizând trecerea la structura mai destinsă, în zig-zag a β-keratinei, cu legături de hidrogen intercatenare. Din cauza volumului mare şi a sarcinilor electrice ale radicalilor R, această formă întinsă este instabilă şi trece spontan în formă α-helix. Există deci, o transformare reversibilă între cele două modele structurale, în condițiile menționate:

α-Keratină (α-helix) ⇌ β-Keratină (foaie pliată)

Modelul structurii în planuri pliate corespunde unui număr mare de proteine fibrilare, conformația sa permițând orientarea catenelor proteice de-a lungul fibrei. În majoritatea lor, proteinele corespund tipurilor structurii secundare α-helix şi planuri pliate.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

IV.2.2.3. Modelul de tip colagen

Structura de tip colagen se deosebeşte de modelele α-helix şi planuri pliate, caracteristice majorității substanțelor proteice.

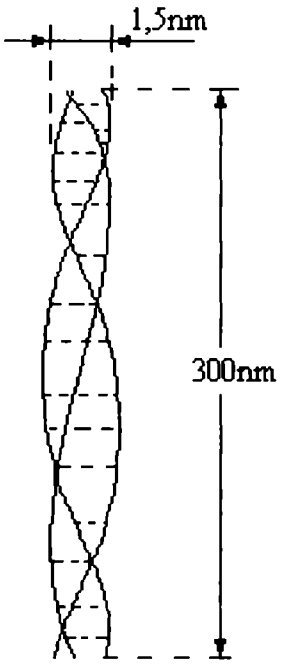


Fig.IV.7 – Structura unității de bază a colagenului (Tropocolagenul)

Prin studii de difracție a razelor X s-a stabilit că structura colagenului se prezintă în forma unui triplu helix. Molecula sa este alcătuită din trei catene polipeptidice dispuse într-un aranjament, în care fiecare catenă este răsucită în spirală spre stânga în jurul axei sale şi, în acelaşi timp, răsucită spre dreapta în jurul axei comune. Se constituie astfel structura specifică de triplu helix respectiv, un superhelix, cu pasul de 2,86nm.

În această alcătuire, catenele polipeptidice sunt strâns unite prin legături de hidrogen intercatenare.

În ansamblu, întregul edificiu apare într-o reprezentare simplificată, ca o funie împletită.

Fiecare catenă polipeptidică de colagen are masa moleculară de 95KDa, este o elice cu orientare spre dreapta, alcătuită din 1000 resturi de aminoacizi. O spiră conține 3,3 resturi de aminoacizi şi are o înălțime de 1nm. Distanța dintre doi aminoacizi, măsurată pe direcția axei lungi, este 0,286nm.

Coeziunea dintre catenele polipeptidice din triplu helix este asigurată prin legăturile de hidrogen intercatenare, cu o dispunere perpendiculară pe axa lungă a aranjamentului tricatenar.

Cu toate că secvența de aminoacizi a colagenului din diverse specii este diferită, majoritatea tipurilor de colagen conține circa 35% glicină, 11% α-alanină, 12% prolină şi 9% 4-hidroxiprolină (Hyp). Prin conținutul in glicină şi α-alanină, colagenul se aseamănă cu β-keratinele, iar prin conținutul de prolină, 3- şi 4-hidroxiprolină diferă de toate celelalte proteine.

În afară de aceşti aminoacizi, în structura colagenului mai apar 5-hidroxilisina (Hyl) şi 3-hidroxiprolina, dar în cantități mici.

Studii cu atomi marcați radioactiv au stabilit că aceşti hidroxi-aminoacizi nestandardizați nu sunt încorporați în colagen în timpul sintezei polipeptidei. Astfel, dacă se administrează şobolanilor 4-hidroxiprolina cu ^{14}C, colagenul sintetizat de aceştia este neradioactiv, pe când administrarea de prolină cu ^{14}C, conduce la colagen radioactiv. Resturile hidroxilate apar după biosinteza polipeptidelor, când un număr mic de resturi de prolină sunt convertite la Hyp, printr-o reacție catalizată de enzima prolil hidroxilaza.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Hyp conferă stabilitate colagenului, probabil datorită legăturilor de hidrogen intramoleculare care pot reține molecule de apă.

Astfel, sintetizând colagenul în condiții în care prolil hidroxilaza este inactivată, conformația nativă obținută se denaturează la 24°C, pe când colagenul normal se denaturează la 39°C (colagenul denaturat este cunoscut sub numele de gelatină).

Pentru a-şi menține activitatea enzimatică, prolil hidroxilaza reclamă prezența vitaminei C. De aceea, carența în vitamină C a organismului conduce la leziuni ale pielii şi la fragilitatea vaselor sanguine.

În mamifere sunt aproximativ 17 catene polipeptidice distincte genetic, conținând 11 tipuri de colagen, întâlnite în diverse țesuturi, dintre care cele mai importante sunt:

-tipul I, cu o compoziție catenară $[\alpha_1(I)]\alpha_2(I)$, întâlnit în piele, oase, tendoane, vase sanguine şi cornee;

-tipul II, $[\alpha_1(II)]_3$, înâlnit în cartilagii şi discuri intervertebrale;

-tipul III, $[\alpha_1(III)]_3$, găsit în vasele de sânge şi învelişul fetal.

Deoarece catenele polipeptidice ale colagenului iau conformația α-helix, se numesc şi α-catene. În α-catene, datorită faptului că atât secvența de aminoacizi cât şi hidroxilările la nivelul resturilor de prolină şi lisină nu sunt identice, rezultă două tipuri de catene, respectiv α_1 şi α_2, păstrându-şi această semnificație în formulele de mai sus.

În catenele polipeptidice de colagen se întâlnesc foarte des secvențele Gly-X-Pro, Gly-Pro-X şi Gly-X-Hyp, unde X este un aminoacid oarecare, aşa cum se observă din fragmentul polipeptidic prezentat în fig.IV.8.

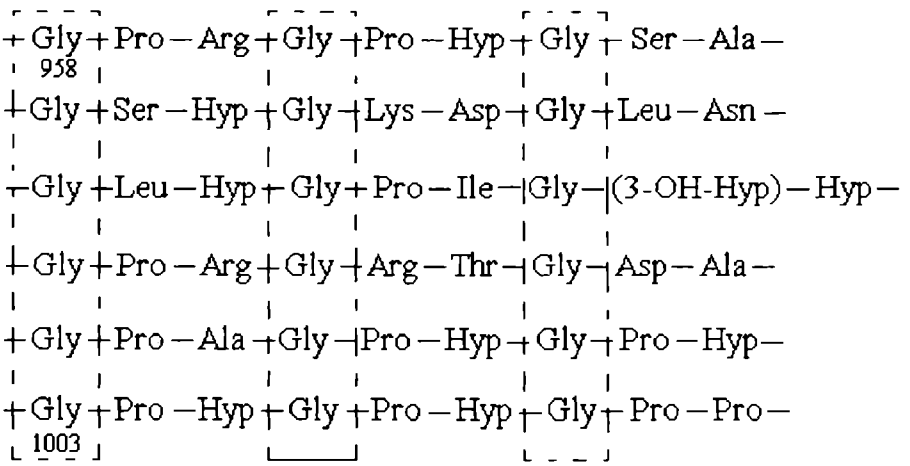

958
Gly Pro – Arg Gly Pro – Hyp Gly Ser – Ala –
Gly Ser – Hyp Gly Lys – Asp Gly Leu – Asn –
Gly Leu – Hyp Gly Pro – Ile Gly (3-OH-Hyp) – Hyp –
Gly Pro – Arg Gly Arg – Thr Gly Asp – Ala –
Gly Pro – Ala Gly Pro – Hyp Gly Pro – Hyp –
Gly Pro – Hyp Gly Pro – Hyp Gly Pro – Pro –
1003

Fig.IV.8 – Secvența aminoacizilor din zona C-terminală a unei catene polipeptidice $\alpha_1(I)$ din colagenul bovin

Prezența în număr mare a resturilor de prolină imprimă lanțului polipeptidic aranjamentul elicoidal colagen-caracteristic. Radicalii R ai glicinei (R=H) mult mai mici, dispuşi repetat în fiecare a treia pozitie în secvență, permit aranjarea celor tei catene în triplu helix, aflându-se în punctele de intersecție ale catenelor.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Colagenul este alcătuit din subunități care se repetă, structurând molecule tricatenare de tropocolagen, ce au capete distincte. Acestea sunt ordonate cap la coadă, în multe mănunchiuri paralele. Aici, capetele apar în trepte, fiecare moleculă de tropocolagen fiind deplasată față de cea alăturată, cu un sfert din lungimea ei, fapt care explică valoarea caracteristică de cca 70nm a distanței unităților repetitive în fibrele de colagen din diferite specii. Fibra de colagen capătă astfel un aspect striat, cu zone mai clare, separate de zone întunecate (fig.IV.9).

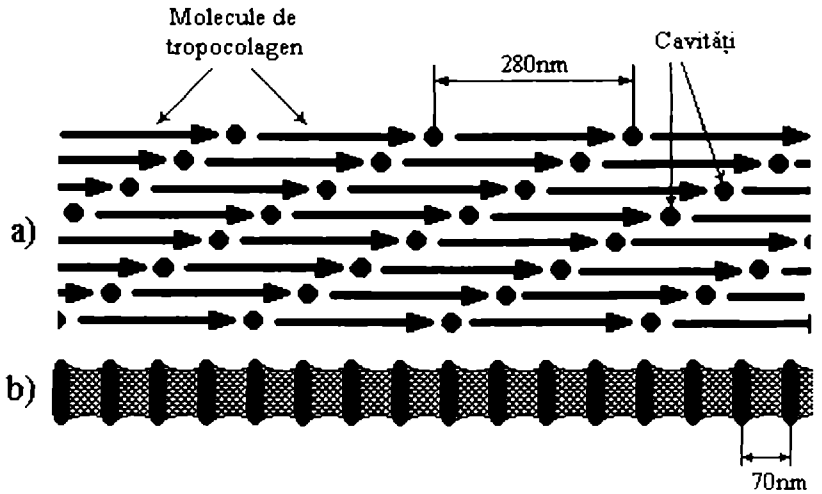
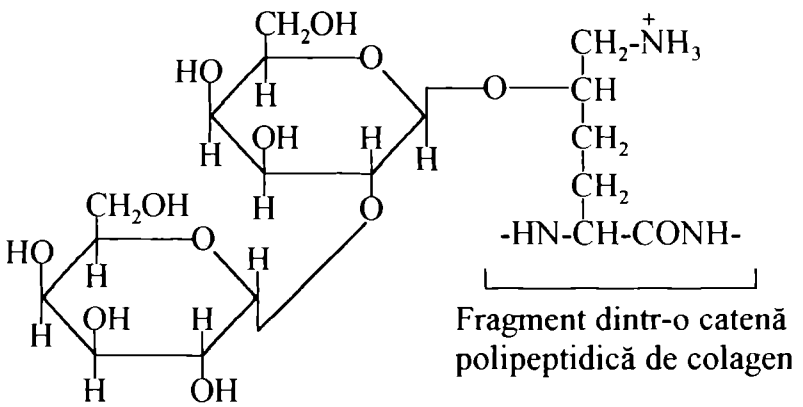


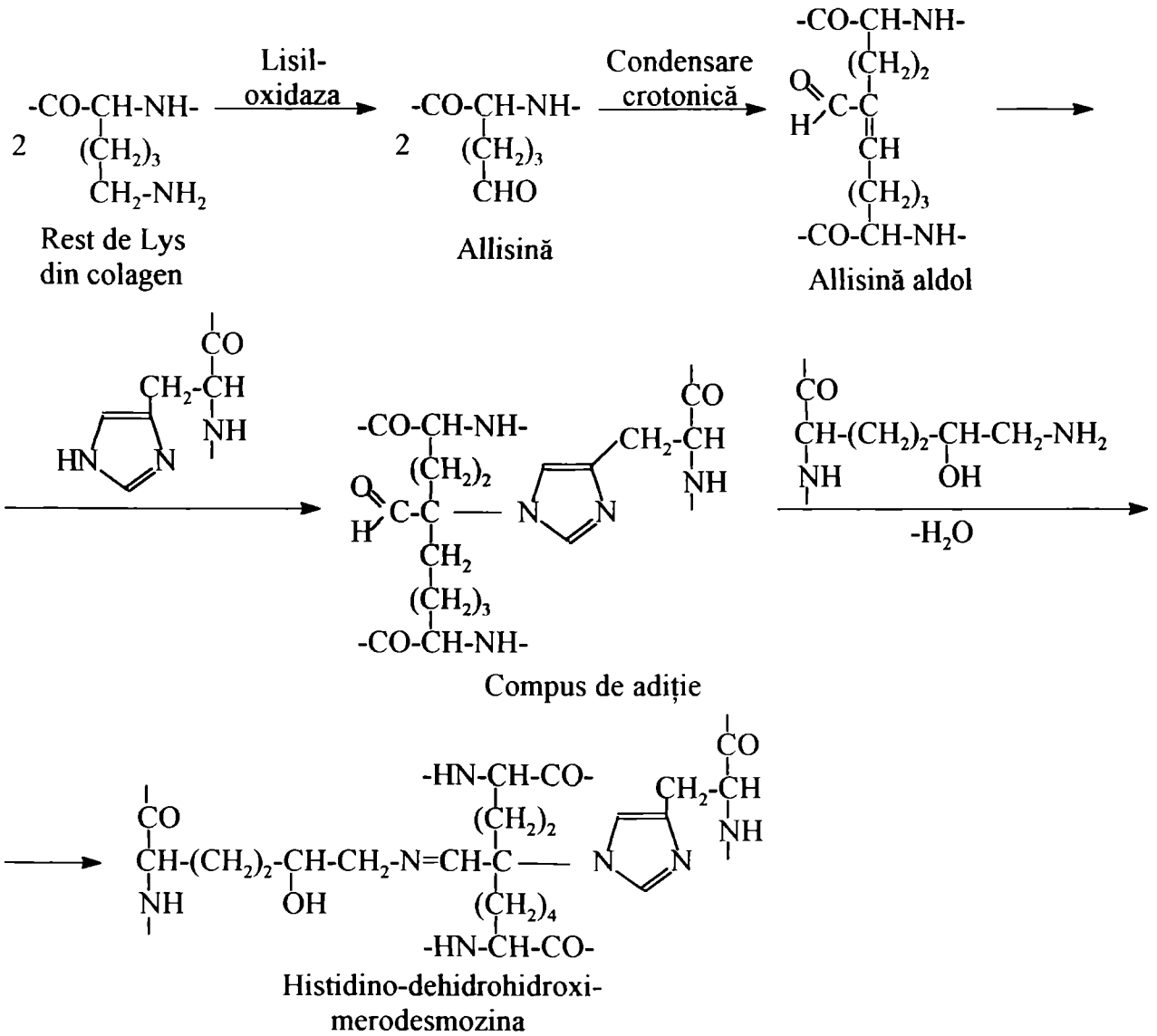
Fig.IV.9 – Detalii asupra structurii fibrelor de colagen
a)Reprezentarea schematică a aranjării în trepte a tropocolagenului în fibra de colagen;
b)Structura unei fibre de colagen văzută la microscopul electronic

Colagenul conține și glucide, în special glucoză, galactoză și diglucidele formate din acestea (0,4-12% din greutate). Glucidele sunt legate enzimatic, covalent, prin legături glicozidice, de resturile hidroxilisinei din catena sa polipeptidică.



În astfel de aranjamente, glucidele sunt plasate în zona cavităților din fibrele de colagen. Rolul acestor glucide nu este bine stabilit, dar se crede că intervin în direcționarea asamblării fibrei. În afara legăturilor de hidrogen intercatenare, în molecula colagenului mai apar și legături covalente, încrucișate, intra și intercatenare. Acestea nu pot fi legături disulfurice, deoarece colagenul este foarte sărac în cisteină și cistină. Ele se formează prin reacții enzimatice din resturile de lisină și histidină existente chiar în catenele de colagen.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



În acest mod se leagă încrucişat, prin legături covalente, moleculele de tropocolagen. Se pot forma şi legături intramoleculare covalente, între catenele polipeptidice ale tropocolagenului.

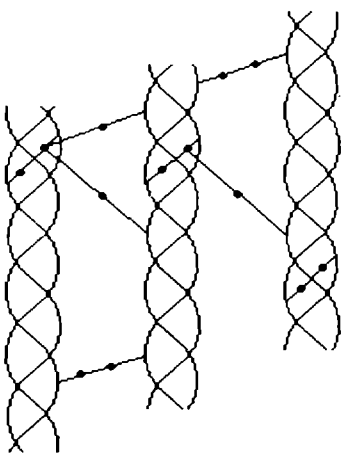


Fig.IV.10 – Legături covalente încrucişate, intra şi intermoleculare în colagen

Lărgimea şi tipul legăturilor încrucişate variază cu funcția fiziologică şi vârsta țesutului.

Astfel, gradul de reticulare (formare de legături încrucişate) creşte cu vârsta animalului, ceea ce explică de ce carnea animalelor bătrâne este mai tare decât cea a animalelor tinere. De fapt, moleculele individuale de colagen (tropocolagenul) pot fi extrase numai din țesuturile animalelor tinere.

În diverse țesuturi (tendoane, cartilageii etc.), fibrele de colagen sunt organizate în corelație cu funcția îndeplinită de acestea.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Perturbările care pot apărea in structura colagenului sunt responsabile de o serie de boli umane. Aceste perturbări pot include substituirea unui aminoacid din lantul polipeptidic al colagenului (ceea ce poate duce la ruperea triplului helix sau chiar a segmentului respectiv polipeptidic).

Apar afecțiuni ca: sindromul Ehler-Danlos (caracterizat prin hiperextensibilitatea pielii şi încheieturilor); sindromul Marfan (cu simptome asemănătoare); osteogeneza imperfectă; osteoartrite (afectarea cartilagiilor); plăci aterosclerotice (afectarea arterelor) etc.

IV.2.3. Structura terțiară

Prin structură terțiară se înțelege un nivel de organizare structurală superioară, complexă, prin care o macromoleculă proteică adoptă o arhitectură spațială specifică. Aceasta, în funcție de anumite particularități catenare (şi factori constrictivi), generate şi condiționate de structura primară a catenelor polipeptidice proprii.

S-a menționat anterior (paragraful IV.2.2.1) că, pentru un număr mare de proteine, structura secundară nu corespunde integral unui aranjament α-helix ordonat. În catena proteică alternează regiuni spiralate ordonat cu segmente nespiralate, dezorganizate. În proteinele globulare s-a constatat că segmentele peptidice dezorganizate conțin în secvență aminoacizi helix deformatori şi helix destabilizatori, care prin efectul lor conferă catenelor polipeptidice posibilitatea producerii unor inflexiuni, imprimându-le o anumită flexibilitate.

Prin interacțiile ce pot avea loc între diferitele grupe din structura radicalilor R a resturilor de aminoacizi, condiționate de factori sterici şi electrostatici şi prin existența acestor porțiuni dezorganizate, catena proteică este forțată să adopte o conformație specifică, impusă de toți aceşti factori care, în ultimă instanță, sunt dirijați genetic, prin intermediul structurii primare.

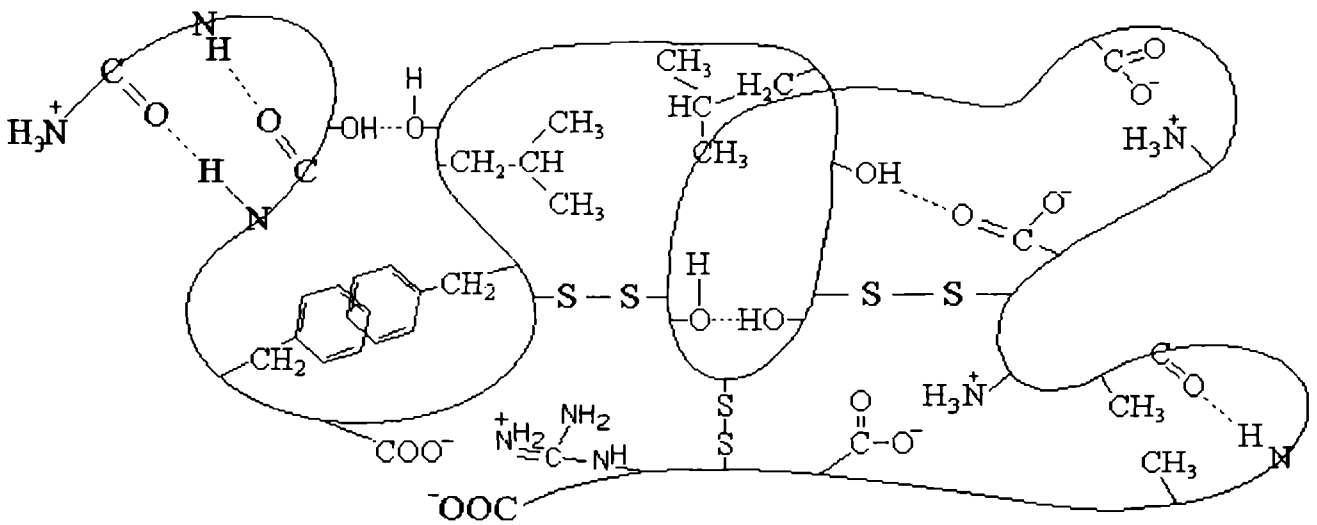


Fig.IV.11 – Catenă proteică în structură terțiară

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

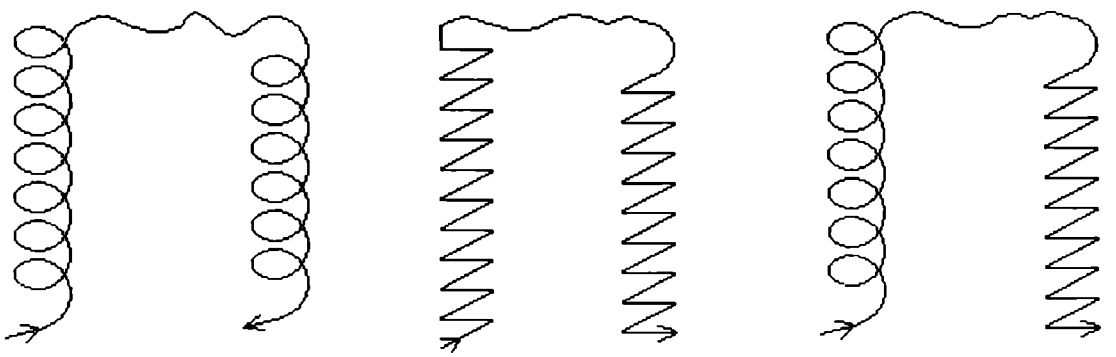
Formula de mai sus înfăţişează o catenă proteică, într-o formă simplificată, având structură terţiară. Aceasta ilustrează schematic, diversitatea naturii chimice a legăturilor şi interacţiilor care contribuie la formarea, consolidarea şi menţinerea ei.

Se întâlneşte deci, o diversitate de interacţii de natură covalentă şi necovalentă.

Secvenţa de aminoacizi induce o serie de restricţii asupra rotirii libere a atomilor C_α în jurul legăturilor simple pe care le are în catenă cu atomii C şi N, jucând un rol determinant în crearea structurii terţiare a proteinelor globulare. Restricţiile menţionate cuprind o serie de factori ca: planeitatea şi rigiditatea grupelor peptidice, unghiurile Φ şi Ψ ale legăturilor C_α-C şi C_α-N permise, numărul şi localizarea resturilor purtând grupe hidrofobe sau încărcate electric.

Toţi aceşti factori determină marea varietate structurală şi funcţională a termenilor proteici, astfel încât fiecare proteină este o entitate mică, cu un înalt grad de complexitate.

Reiese clar că principalele tipuri structurale comune întâlnite în proteine sunt modelele α- helix şi β-conformaţia, care apar în proporţii şi combinaţii variate:



a) α, α– b) β, β– c) α, β–

S-a insistat până acum mai mult pe modelul α-helix, unde s-a arătat că, de fapt, segmente spiralate alternează cu segmente nespiralate (a), facilitând prin aceasta, alcătuirea unei conformaţii încolăcite.

Ca exemplu poate fi dată mioglobina, prima proteină cu structură determinată cu raze X, de către John Kendrew şi Perutz în 1950 (fig.IV.12).

Molecula mioglobinei este formată dintr-un lanţ polipeptidic având 153 resturi de aminoacizi şi o grupă prostetică, hemul.

Lanţul polipeptidic al mioglobinei conţine cca. 70% α-helix distribuit în 8 regiuni separate, alternativ, prin 7 segmente mai scurte, nespiralate. Cercetările au continuat intens, realizându-se determinarea structurii la peste 200 de proteine.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

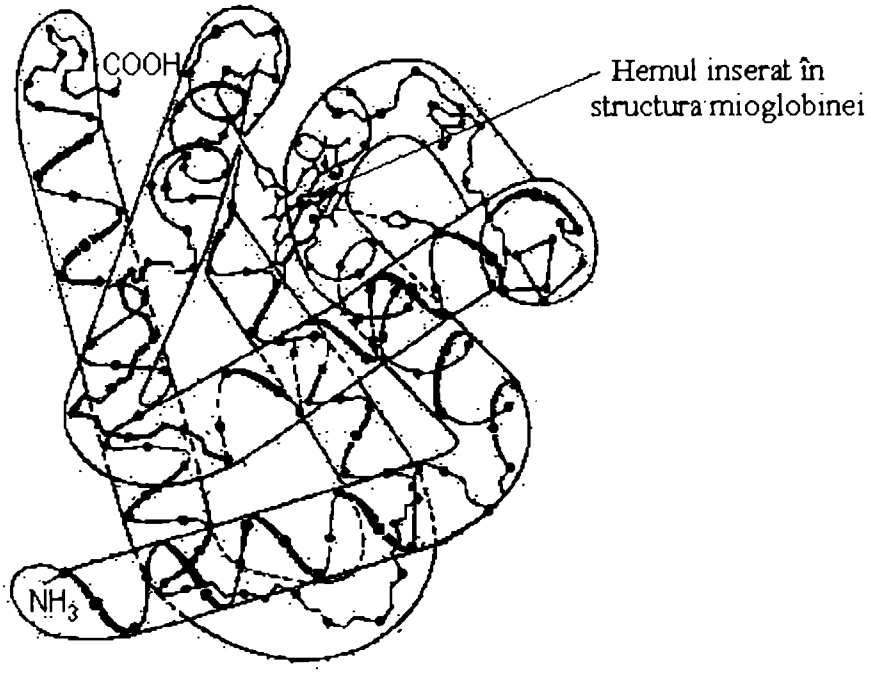


Fig.IV.12 – Structura mioglobinei

Punctele negre reprezintă resturile de aminoacizi în structură primară;
segmentele spiralate=structură secundară; forma de ansamblu=structura terțiară

În alte proteine, α-helixul lipseşte complet, însă β-conformația există într-un procent ridicat. Aici segmente peptidice cu β-conformație alternează cu segmente peptidice scurte, dezorganizate (b). Ca exemplu poate fi menționată concanavalina A, o proteină din fasole, care conține segmente proteice lungi, cu planuri pliate, în orientarea antiparalelă, legate de segmente peptidice scurte, dezorganizate.

Există totuşi şi multe proteine care conțin în cantități apreciabile din ambele tipuri de structură secundară: α-helix şi planuri pliate (c). Pentru exemplificare pot fi date, în acest caz, anhidraza carbonică umană, carboxipeptidaza şi triozofosfat izomeraza.

Figura IV.11 înfățişează, într-o formă simplificată, o catenă proteică având structură terțiară, de unde se poate observa diversitatea naturii chimice a legăturilor şi interacțiilor care contribuie la formarea, consolidarea şi menținerea aceste structuri. Se întâlneşte prin urmare, o diversitate de legături de natură covalentă şi necovalentă.

Legătura covalentă şi cea mai trainică dintre toate, este în acest caz legătura disulfurică, care uneşte două resturi de cisteină din secvența moleculelor proteice. În unele proteine, legătura disulfurică –S–S– lipseşte, în altele apare numai intracatenar sau numai intercatenar, iar în altele pot fi întâlnite concomitent, ambele tipuri de legături.

Alte legături, cum ar fi legăturile de hidrogen, ionice şi prin forțe van der Waals, sunt slabe, dar prin numărul lor mare contribuie la consolidarea edificiului molecular.

Legătura ionică (legătura electrostatică) se stabileşte între grupele funcționale cu sarcini electrice de semn contrar, la distanțe de 0,2-0,31nm.

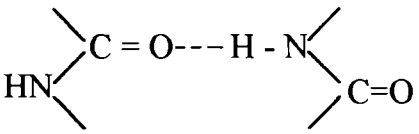
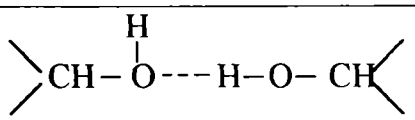
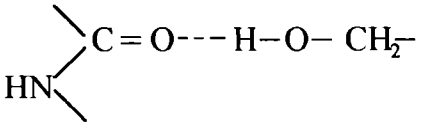
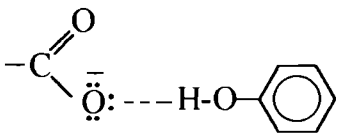
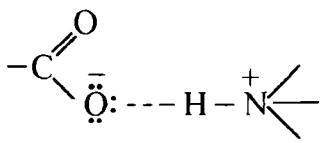
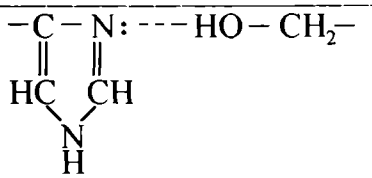
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În principal, încărcate negativ sunt grupele carboxilat din resturile acizilor aspartic, glutamic şi C-terminale, iar cele încărcate pozitiv sunt grupele amino-protonate, respectiv ε-amino din resturile lisinei, grupa N-terminală, precum si grupa guanidiniu.

Pentru a forma această legătură, perechile de ioni cu semne contrare trebuie să aibă o dispunere convenabilă sau potențial convenabilă. În afara interacției dintre ele, grupele încărcate electric din molecula proteinei pot atrage şi alți ioni cu semn contrar sau molecule, din soluție.

Legătura de hidrogen se formează între un atom de hidrogen legat de un atom puternic electronegativ şi un alt atom electronegativ, cu electroni neparticipanți, dintr-o altă grupă funcțională sau moleculă. Principalele tipuri de legături de hidrogen în cazul proteinelor sunt $-O-H\cdots O-$, cu lungimea de 0,27nm şi $-N-H\cdots O-$ de 0,31nm (tabelul IV.3).

Tabelul IV.3 – Principlalele legături de hidrogen din proteine

1	Între grupe peptidice	
2	Între grupe hidroxil	
3	Între grupa peptidică şi –OH de la serină	
4	Între grupa carboxilică încărcată şi –OH din tirozină	
5	Între grupele amino şi carboxil ionizate	
6	Între grupa –OH a serinei şi un atom de azot din inelul imidazolic al histidinei	

În mediul intracelular din materialele biologice, proteinele se găsesc în soluții apoase, unde moleculele apei intră în competiție cu anumite grupe pentru formarea legăturilor de hidrogen, slăblindu-le prin aceasta pe cele existente, proprii.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Legăturile apolare (hidrofobe) se formează prin asocierea părților hidrocarbonate, hidrofobe, ale resturilor de aminoacizi, între ele, în soluții apoase, pe baza forțelor de atracție van der Waals. Aceste forțe sunt slabe, de natură electrostatică și se manifestă între atomi pe distanțe mici (0,31-0,41nm).

Resturile hidrocarbonate ale aminoacizilor între care pot interveni forțe van der Waals sunt radicalii: metil din α-alanină, benzil din fenil alanină, izopropil din valină, izobutil din leucină și sec-butil din izoleucină.

În cadrul structurii terțiare, o structură compactă caracteristică proteinelor globulare, catena polipeptidică se repliază, se împachetează de așa manieră încât acele segmente polipeptidice din secvența sa care conțin în majoritate radicalii R hidrofobi, să fie amplasate, pe cât posibil, spre interiorul aranjamentului macromolecular, iar cele cu caracter hidrofil, spre exterior. Aceasta datorită faptului că grupele hidrofobe tind să evite prezența moleculelor de apă și de aceea se orientează spre interiorul moleculei proteice, unde apa nu se găsește. În sens fizic, această tendință este o forță, considerată ca forță hidrofobă. Forțele hidrofobe au o mare importanță în condiționarea structurii la nivel superior, având în vedere că marea majoritate a proteinelor conțin resturi apolare într-o proporție însemnată.

IV.2.4. Structura cuaternară

La nivel macromolecular, gradul maxim de organizare structurală a proteinelor se concretizează în structura cuaternară. Aceasta este caracteristică proteinelor globulare cu mase moleculare de peste 50KDa. În cadrul acestei structuri, catenele polipeptidice din proteine având toate celelalte nivele de organizare bine definite (structurile primară, secundară și terțiară), se asociază între ele prin legături necovalente formând agregate mari, multicatenare, cu o deosebită complexitate structurală și funcțională (fig.IV.13).

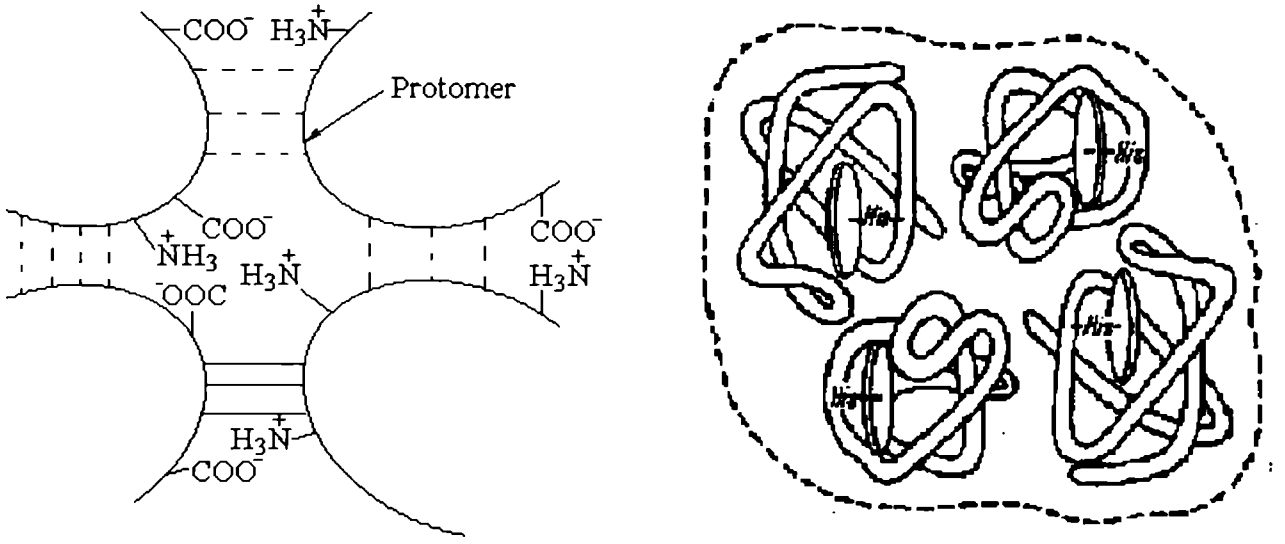


Fig.IV.13 – Exemple de structură cuaternară (tetrameră)

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Prin faptul că sub acțiunea unor agenți fizici sau chimici catenele polipeptidice se pot desprinde cu ușurință din agregatul multicatenar, se poate trage concluzia că legăturile covalente, în special legăturile disulfurice nu participă la formarea structurii cuaternare.

Pe de altă parte, având în vedere că prin particularitățile structurii terțiare majoritatea radicalilor R cu caracter hidrofob ai resturilor de aminoacizi sunt orientați către interiorul aranjamentului proteic, împachetat intracatenar, participarea interacțiilor hidrofobe la alcătuirea structurii cuaternare este puțin semnificativă. Rămân deci, efective, în consolidarea structurii cuatrenare legăturile ionice și de hidrogen.

Fiecărui tip de proteină îi corespunde un anumit mod de organizare spațială intercatenară, deci structură cuaternară cu o conformație proprie, care se manifestă prin proprietăți și în funcțiile biologice specializate.

În acest context, catenele proteice participante la agregarea multicatenară se numesc protomeri sau subunități, iar agregatul multicatenar, oligomer. După numărul de protomeri, formațiunea oligomeră se va găsi în stare de dimer, trimer, tetramer etc.

Tabelul IV.4 – Proteine oligomere

Proteina	Masa proteinei (KDa)	Număr de protomeri	Masa protomerilor (KDa)
Fosfataza alcalină	80	2	40
Creatin kinaza	80	2	40
Hemoglobina	64,5	4	16
Lactat dehidrogenaza	150	4	35
Ceruloplasmina	151	8	18
Aldolaza	160	4	40
Piruvat kinaza	237	4	57
Glicogen fosforilaza	270	4	92,5
Miozina	468	2	212
Glutamin sintetaza	592	12	48,5

Caracteristică acestor proteine este înalta lor specificitate biologică, care se manifestă, în general, la nivelul întregului ansamblu oligomer. Luat separat, fiecare protomer pierde specificitatea biologică proprie oligomerului.

Un exemplu îl constituie hemoglobina, pigmentul roșu respirator din eritrocite, alcătuită din patru catene polipeptidice care, deși sunt asociate între ele prin legături slabe, necovalente configurează un agregat compact, cu o mare stabilitate.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

La proteinele oligomere pare oarecum ciudat să vorbim despre molecule şi mase moleculare; ele sunt formate din două sau mai multe catene proteice, unite prin legături necovalente, slabe. Argumentul hotărâtor în acceptarea termenilor de moleculă şi masă moleculară, în acest caz, îl constituie faptul că în cele mai multe proteine oligomere, lanţurile protomerilor sunt strâns unite între ele. Astfel, oligomerul se comportă în soluţie ca o singură moleculă, iar pentru manifestarea proprietăţilor biologice specifice sunt necesari toţi protomerii ansamblului multicatenar.

Există şi proteine care nu au structură cuaternară, ca de exemplu ribonucleaza, chimotripsina etc. Mijlocul prin care se poate depista prezenţa acestei structuri este denaturarea slabă (prin diluarea soluţiei proteinei, prin acidulare, prin introducere de ioni metalici etc.). Dacă în aceste condiţii de denaturare, specifice scindării oligomerilor, nu rezultă protomeri înseamnă că proteina nu prezintă structură cuaternară.

Moleculele proteinelor naturale reproduse în laborator şi care în mod normal se caracterizează prin prezenţa structurii cuaternare, au tendinţa de a se asocia spontan, cu refacerea acestei structuri.

La nivel celular, structura cuaternară a proteinelor joacă un rol foarte important. Astfel, această structură formează o "anvelopă" protectoare, fie în jurul nucleului (purtător de informaţie genetică), fie in jurul produsului unei reacţii enzimatice (împiedicându-se difuzarea sa în mediul celular, în timp ce se aşteaptă interacţia cu o nouă enzimă, corespunzătoare altei secvenţe reacţionale).

IV.3. Proprietăţi generale

Proprietăţile proteinelor apar ca forme de manifestare a structurii lor de ansamblu. Pentru a avea o bună înţelegere a proprietăţilor proteinelor este recomandabil ca acestea să fie studiate într-o strânsă corelaţie cu structura lor. Aceasta pentru că orice modificare intervenită în structura proteinelor, va atrage după sine modificări şi în proprietăţi.

IV.3.1. Solubilitatea, precipitarea şi denaturarea proteinelor

În contrast cu caracterul lor macromolecular, multe proteine, cu precădere proteinele globulare, sunt mai mult sau mai puţin solubile în apă şi insolubile în solvenţi organici, în special în solvenţii nepolari.

Solubilitatea lor este determinată de modul în care sunt repartizate grupele polare şi nepolare pe suprafaţa macromoleculelor proteice. Grupele polare, hidrofile, predominante pe suprafaţa moleculelor proteice, conform structurii terţiare, formează legături de hidrogen cu moleculele apei, favorizând solubilitatea în apă şi defavorizând-o pe cea în solvenţii organici.

Existenţa pe suprafaţa moleculelor şi a unor grupe nepolare, influenţează pozitiv solubilitatea anumitor proteine în soluţii alcoolice apoase.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

O serie de solvenți organici miscibili cu apa, cum sunt metanolul, etanolul, acetona etc., precipită proteinele din soluție. Acțiunea lor precipitantă se explică pe baza modificării constantei dielectrice a mediului, pe de o parte şi printr-un efect deshidratant , pe de altă parte.

Constanta dielectrică (ε) intervine în relația Coulombiană: $F = e_1 \cdot e_2 / \varepsilon \cdot r^2$, împreună cu factorii e_1, e_2, care reprezintă sarcini electrice şi r – distanța dintre ele, exprimând laolaltă, forță de atracție (sau de respingere) Coulombiană (F).

În tabelul IV.5 se observă variația lui ε în diferiți solvenți.

Tabelul IV.5 – Constantele dielectrice ale unor lichide, la 25°C

Nr. crt.	Substanța	Constanta dielectrică (ε)
1	n-Hexan	1,89
2	Tetraclorură de carbon	2,24
3	Benzen	2,27
4	Eter etilic	4,25
5	Cloroform	4,75
6	Acetonă	20,7
7	Metanol	
8	Etanol	24,3
9	Nitrobenzen	34,82
10	Apă	78,54
11	Acid cianhidric	107

Apa având o constantă dielectrică foarte mare (~80), potrivit legii lui Coulomb produce o diminuare a forței de atracție electrostatică dintre sarcinile contrare de pe molecule proteice învecinate, favorizând rămânerea lor în soluție (solubilizarea). Introducerea în soluție a solvenților organici cu constantă dielectrică mică, va contribui la scăderea constantei dielectrice a mediului şi, prin aceasta, la creşterea forței de atracție electrostatică dintre sarcinile de semn contrar, facilitând agregarea moleculelor proteice prin formarea legăturilor ionice, ceea ce favorizează precipitarea.

Pe de altă parte, efectul solvenților organici este implicat direct în procesul solubilizării proteinelor în mediu apos şi prin faptul că moleculele lor intră în competiție cu moleculele proteice, față de apă, producând deshidratarea şi, în consecință, precipitarea proteinelor din soluție.

Solubilitatea proteinelor globulare este mult influențată de pH, prin efectul de ionizare produs la nivel molecular.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În general, solubilitatea în funcție de pH se reprezintă printr-o curbă în formă de "U" la punctul izoelectric (pH_i).

Se observă din fig.IV.14 că solubilitatea β-lactoglobulinei este minimă la pH=5,2-5,3, fără a ține seamă de concentrația NaCl.

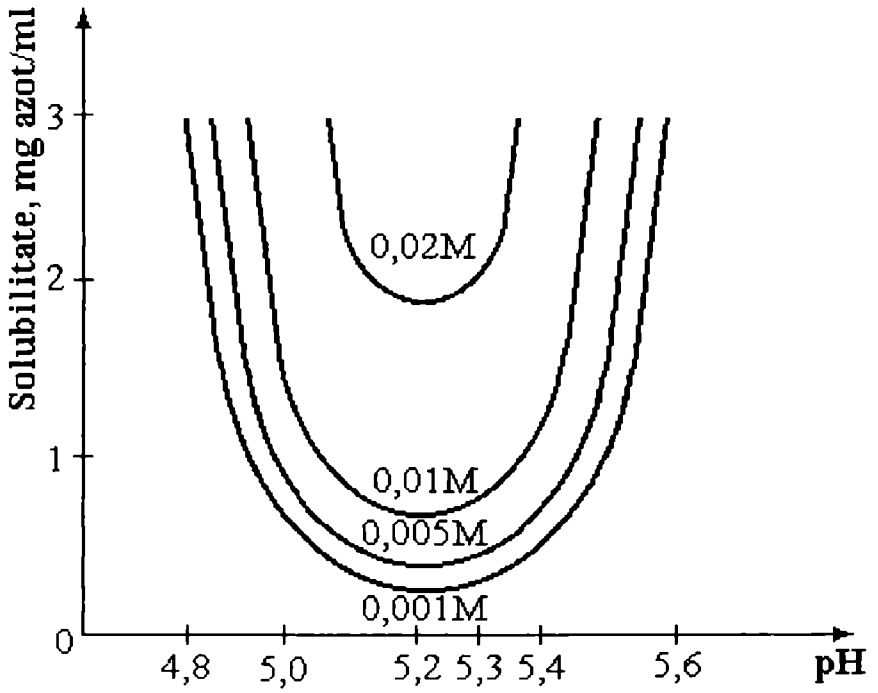


Fig.IV.14 – Solubilitatea β-lactoglobulinei în funcție de pH și concentrația în NaCl

La punctul izoelectric, moleculele proteinelor se găsesc sub formă de amfioni, fără o sarcină netă pe moleculă. Repulsiile electrostatice dintre aceste molecule fiind minime, vor fi favorizate asocierea și depunerea lor sub formă de precipitate.

Sub aspect energetic, forțele de coeziune dintre moleculele proteinelor aflate în soluție fiind mult mai mici decât între cele aflate în stare solidă (unde există forțele de rețea), sistemul evoluează în sensul unei mai mari stabilități, corespunzând stării solide.

Precipitarea la punctul izoelectric are o deosebită importanță practică, putând fi aplicată la obținerea proteinelor din soluțiile lor sau la separarea fracționată a diferitelor tipuri de proteine aflate în amestec, pe baza diferenței valorice dintre punctele lor izoelectrice.

Punctele izoelectrice diferă de la o proteină la alta, după cum se poate observa din tabelul IV.6.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabelul IV.6 – Punctul izoelectric al unor proteine

Nr. crt.	Proteina	pH_i
1	Pepsina	1,0
2	Ovalbumina	4,6
3	Albumina serică	4,9
4	Ureaza	5,0
5	β-Lactoglobulina	5,2
6	γ_1-Globulina	6,6
7	Hemoglobina	6,8
8	Mioglobina	7,0
9	Ribonucleaza	9,6
10	Chimotripsinogen	9,5
11	Citocrom c	10,6
12	Lizozim	11,0

La valori mai mici sau mai mari decât pH_i, deci prin tratarea cu acizi sau baze diluate, moleculele proteice trec în cationi şi respectiv, în anioni. Potrivit mediului, între moleculele proteice purtând aceeaşi sarcină electrică, au loc repulsii electrostatice, deplasându-le în soluție.

Soluțiile acide sau bazice concentrate având pH spre valori extreme, distrug legăturile ionice şi de hidrogen, producând denaturarea proteinelor, însoțită de precipitare.

Față de soluțiile apoase ale sărurilor neutre ale metalelor alcaline sau alcalino-pământoase sau a sărurilor de amoniu, proteinele se comportă diferențiat, în funcție de concentrația lor. Soluțiile diluate ale acestor săruri favorizează dizolvarea proteinelor, în timp ce soluțiile concentrate la precipită. Factorul determinant în această comportare diferențiată este tăria ionică a soluției saline, care se calculează după relația:

$$\mu = \frac{1}{2}\sum C_i Z_i^2 = \frac{1}{2}\left(C_1 Z_1^2 + C_2 Z_2^2 + ... + C_n Z_n^2\right),$$

unde: μ = tăria ionică a soluției saline;

C_i = concentrația fiecărui ion din mediu (i=1, 2, 3, ..., n);

Z = sarcina (electrovalența) fiecărui ion.

Exemple:

1) Pentru o soluție 0,1M de NaCl:

$$\mu = \frac{1}{2}\left(0{,}1x1^2 + 0{,}1x1^2\right) = 0{,}1$$

Se observă că, pentru o sare cu ioni monovalenți, tăria ionică este egală cu molaritatea soluției.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2) Pentru o soluție 0,1M de Na_2SO_4:

$$\mu = \frac{1}{2}\left(0,2x1^2 + 0,1x2^2\right) = 0,3$$

Ionii di- şi trivalenți sunt mai eficienți decât cei monovalenți. În mod curent, se folosesc în acest scop $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4$ şi fosfați.

Când tăria ionică este mică, ionii din soluție neutralizează şi stabilizează grupele polare încărcate electric. Între ionii de acelaşi semn se produc repulsii electrostatice, favorizând trecerea moleculelor proteice în soluție.

Fenomenul de creştere a solubilității multor proteine globulare în soluții de săruri cu concentrații mici (tărie ionică mică) apare în literatura de specialitate sub denumirea de "salting-in". Prin creşterea tăriei ionice, solubilitatea proteinei începe să scadă, astfel încât, la o tărie ionică suficient de mare, proteinele precipită aproape complet din soluție, efectul numindu-se salifiere sau "salting-out".

Tăria ionica mare favorizează precipitarea proteinelor, prin faptul că ionii soluției saline în tendința lor de hidratare intră în competiție cu proteinele față de moleculele apei şi, sustrăgând acestora apa de solvatare, le forțează să precipite.

Capacitatea de precipitare cu săruri neutre nu este aceeaşi pentru toate proteinele. Globulinele, spre exemplu, precipită uşor, iar albuminele precipită greu. Pe această proprietate se întemeiază una din metodele de separare a proteinelor între ele şi anume, precipitarea fracționată cu săruri neutre.

Precipitarea proteinelor poate fi reversibilă sau ireversibilă. Ea este reversibilă atunci când, după înlăturarea agenților precipitanți, proteinele revin la forma şi proprietățile inițiale. Precipitarea este ireversibilă când, după îndepărtarea agenților care au produs precipitarea, proteinele nu mai revin la forma inițială, pierzându-şi proprietățile fizico-chimice şi biologice proprii.

Precipitarea reversibilă se produce prin acțiunea soluțiilor concentrate ale unor săruri de sodiu, potasiu, magneziu sau amoniu, sau a unor solvenți organici diluați: alcoolul etilic şi acetona. Precipitarea ireversibilă este determinată de o gamă largă de agenți chimici ca: acizii minerali tari (H_2SO_4, HCl, H_3PO_4, $HclO_4$), acizii organici (acizii tricloracetic, sulfosalicilic, picric, tanic etc.), bazele tari (NaOH, KOH), sărurile metalelor grele (Cu, Hg, Fe, Ni, Zn, Ba etc.), alcoolul etilic, acetona şi alte substanțe organice şi anorganice.

Pe această proprietate, o serie de acizi cum sunt acizii fosfovolframic, tricloracetic, picric, sulfosalicilic, percloric etc., sunt utilizați la deproteinizarea unor soluții, deoarece anionii lor formează săruri insolubile în domeniul concentrațiilor acide față de pH_i, unde proteinele se află sub formă de cationi.

În domeniul concentrațiilor alcaline față de pH_i, unde proteinele se găsesc ca anioni, acestea dau săruri insolubile cu cationii metalelor grele. În foarte multe cazuri, precipitarea proteinelor este o consecință directă a procesului de denaturare.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Denaturarea proteinelor este fenomenul potrivit căruia conformația macromoleculelor proteice suferă o dezorganizare a infrastructurilor cuaternară, terțiară și secundară, ca urmare a ruperii unor legături inter- și intracatenare și deplierea lor, sub acțiunea unor agenți fizici sau chimici, fără a afecta structura primară.

Printre agenții fizici denaturanți se numără: căldura, radiațiile UV, ultrasunetele și agitarea, iar agentii chimici sunt: acizii și bazele tari, sărurile metalelor grele, ureea, sărurile de guanidiniu, detergenții, solvenții organici etc.

După gradul dezorganizării structurale produs în funcție de intensitatea și durata acțiunii agenților denaturanți, denaturarea poate fi reversibilă sau ireversibilă.

Denaturarea este reversibilă atunci când moleculele proteice sunt parțial denaturate, structura lor fiind parțial depliată. La îndepărtarea agentului denaturant, structura proteinelor revine la starea normală, ceea ce sugerează că forma nativă a proteinelor este cea mai stabilă în condiții proprii, fiind consolidată de interacții specifice.

Denaturarea este ireversibilă când conformația moleculelor proteice suferă modificări profunde, fiind afectate pe rând structurile cuaternară, terțiară și secundară. După încetarea acțiunii agenților denaturanți, proteinele nu-și mai recapătă structura lor proprie, specifica, pierzându-și proprietățile fizice, chimice și, mai cu seamă, specificitatea biologică.

Mecanismul procesului denaturării variază de la un agent denaturant la altul, după tipul legăturilor pe care aceștia le afectează. Astfel, ureea, sărurile de guanidiniu și formamida distrug legăturile de hidrogen din proteine. Are loc un proces competitiv între legăturile de hidrogen inter- și intracatenare existente în proteinele native și tendința de formare a noilor legături de hidrogen, între acești agenți denaturanți și proteine.

Capacitatea superioară a agenților denaturanți de a forma legături de hidrogen cu anumite grupe funcționale din proteine asigură câștigarea competiției în favoarea lor, determinând dezorganizarea conformației proteice.

Soluțiile acide sau bazice concentrate distrug legăturile ionice și de hidrogen. Detergenții și alte substanțe cu acțiune tensioactivă (de exemplu, acizii biliari) acționează cu partea lor hidrofobă din moleculă asupra grupelor hidrofobe dispuse spre interiorul aranjamentului proteic terțiar, cu care stabilesc noi interacții hidrofobe, producând dezorganizarea edificiului specific, compact. De asemenea, unii solvenți miscibili cu apa produc denaturarea prin efecte care concură la dezorganizarea conformației native a proteinelor.

Modificările structurale produse prin denaturare aduc schimbări radicale în proprietățile fizice, chimice și biologice. Astfel, prin denaturare, solubilitatea unei proteine scade, punctul izoelectric crește, activitatea optică se accentuează, vâscozitatea crește, coeficienții de sedimentare și de difuzie se modifică, capacitatea de cristalizare dispare, iar reacționabilitatea crește.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

O serie de grupe funcționale inaccesibile reacțiilor chimice în proteina nativă ies la iveală, devenind accesibile, ca urmare a deplierii catenelor polipeptidice survenită în cursul denaturării.

În sfârşit, cea mai importantă consecință a denaturării proteinelor constă în pierderea specificității biologice. De aceea, pierderea acestei activități specifice unei proteine este indiciul cel mai sensibil şi sigur asupra modificărilor conformaționale care duc la denaturarea ei.

IV.3.2. Caracterul coloidal al soluțiilor proteice

Proteinele fiind compuşi macromoleculari se prezintă în soluții apoase ca dispersii coloidale, cu mare afinitate pentru apă.

Din această cauză, proteinele manifestă toate proprietățile stării coloidale, ca: fenomenul Tyndall, presiunea osmotică redusă, proprietăți electroforetice (migrarea în câmp electric), puterea de difuzie mică, ultrafiltrarea, echilibrul de membrană Donnan.

Echilibrul Donnan. Acest fenomen se referă la repartizarea ionilor din soluțiile aflate în două compartimente vecine separate printr-o membrană semipermeabilă, atunci când în unul dintre ele se găseşte şi o proteină. Având mase moleculare mari, proteinele prezintă proprietățile unor ioni nedifuzibili, stabilindu-se echilibrul de membrană Donnan, de un tip mai special. Se creează astfel o stare de repartiție inegală a ionilor difuzibili prin membrană în cele două compartimente. În plus, dacă în celălalt compartiment se mai află şi un ion nedifuzibil, apare tendința de stabilire a unui echilibru. Acest echilibru însă, nu reprezintă o egalizare a concentrației ionilor difuzibili.

În figura IV.15 este prezentat fenomenul pe un caz concret, unde într-un compartiment este proteinat de sodiu, iar în celălalt compartiment, clorură de sodiu.

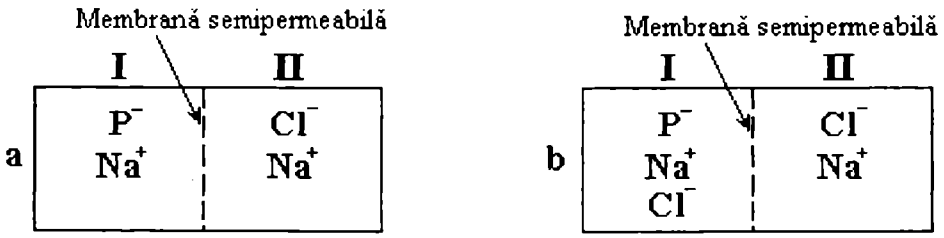


Fig.IV.15 – Echilibrul de membrană Donnan

În fig.IV.15a, este prezentată starea inițială, în care proteinatul de sodiu (P^-Na^+) se află de o parte a membranei (I), iar clorura de sodiu de cealaltă parte (II). În acest stadiu, situația este următoarea:

-în compartimentul I, $[Na^+] = [P^-] = C_1$;

-în compartimentul II, $[Na^+] = [Cl^-] = C_2$; unde P^- este anionul proteic (nedifuzibil), iar C_1 şi C_2 sunt concentrațiile.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Prin membrana semipermeabilă vor trece numai ionii cu volum mic, în funcție de dimensiunea porilor ei, iar cei cu dimensiuni mari, nu pot trece. Migrarea ionilor prin membrană se face în perechi. Vor circula, în cazul de față, numai ionii clorurii de sodiu, până se stabileşte un echilibru.

La echilibru se ajunge la situația prezentată în fig.IV.15b, din care se observă că ionii Cl^- şi Na^+ traversează membrana, situația din cele două compartimente (I şi II) putându-se reprezenta prin relația:

a) $[Cl^-]_I \cdot [Na^+]_I = [Cl^-]_{II} \cdot [Na^+]_{II}$

Când echilibrul s-a stabilit din compartimentul II au difuzat, prin membrană către compartimentul I, un număr x de molecule de NaCl şi situația față de cea inițială devine:

b) I $\begin{cases} [Na^+]_I = C_1 + x \\ [Cl^-]_I = x \end{cases}$

II $[Na^+]_{II} = [Cl^-]_{II} = C_2 - x$

Înlocuind aceste date în relația a), rezultă:

$x(C_1 + x) = (C_2 - x)^2$, de unde înseamnă că:

$x<C_2-x<C_1+x$, respectiv $[Cl^-]_I<[Cl^-]_{II}$ şi $[Na^+]_{II}<[Na^+]_I$

Prin urmare, la echilibru, în primul compartiment în care este prezentă proteina, vor fi mai multi ioni de sodiu şi mai puțini ioni de clor decât în al doilea compartiment. La starea de echilibru, numărul ionilor difuzibili este mai mare de partea proteinei (ion nedifuzibil), presiunea osmotică creşte, stabilindu-se şi o diferență de potențial.

IV.3.3. Proprietățile acido-bazice ale proteinelor

Proteinele, având un număr mare de grupe funcționale pe moleculă, disociabile, de diverse categorii, se comportă în soluție ca polielectroliți:

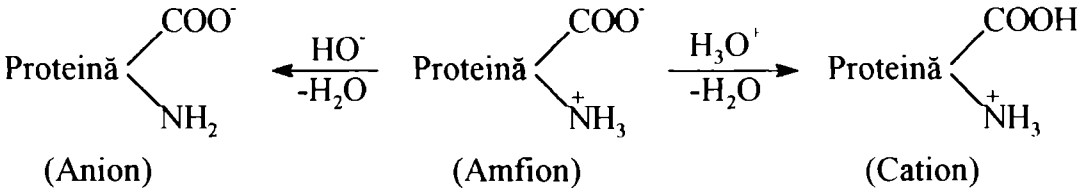
$$(H_3\overset{+}{N})_mR(COO^-)_n$$

O parte dintre acestea, cum este grupa carboxilică din catena laterală a resturilor acizilor aspartic şi glutamic, grupa carboxilică terminală şi, într-o mai mică măsură grupele –OH şi –SH ale resturilor tirozinei, respectiv, cisteinei, disociază formând anioni. Celelalte grupe ca: ε-amino- a restului de lisină, guanidiniu a restului de arginină, imidazolică a restului de histidină şi grupa amino- terminală, prin acceptare de protoni, formează cationi.

Această încărcătură electrică deosebită pe moleculă conferă proteinelor o serie de proprietăți remarcabile, atât sub raport aplicativ cât şi asupra manifestării lor în organism.

A.Caracterul amfoter. Existența grupelor funcționale cu caracter chimic contrar, imprimă proteinelor proprietăți amfotere: se comportă ca acizi sau ca baze, în funcție de pH-ul mediului. În mediu acid reacționează ca baze, iar în mediu bazic, ca acizi:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Rezultă că şi sarcina electrică este influenţată de pH.

Când posedă sarcină electrică netă, macromoleculele proteice se deplasează în câmpul electric (manifestă proprietăţi electroforetice). La punctul izoelectric, notat cu pH_i sau P_i, moleculele nu sunt încărcate electric, se găsesc sub formă de amfioni şi nu prezintă proprietăţi electroforetice. La valori de pH mai mici decât pH_i, proteinele au sarcină pozitivă, deplasându-se în câmpul electric spre catod, iar la valori mai mari, sunt încărcate negativ, migrând spre anod. Viteza de deplasare a ionilor în câmpul electric depinde de sarcina electrică, pH, ionii absorbiţi, mărimea şi forma particulelor şi constituie o caracteristică pentru separarea electroforetică a proteinelor.

B.Curbe de titrare. Prin reprezentarea grafică a datelor obţinute la titrarea soluţiilor proteice cu acizi sau baze, se obţin diagrame complexe.

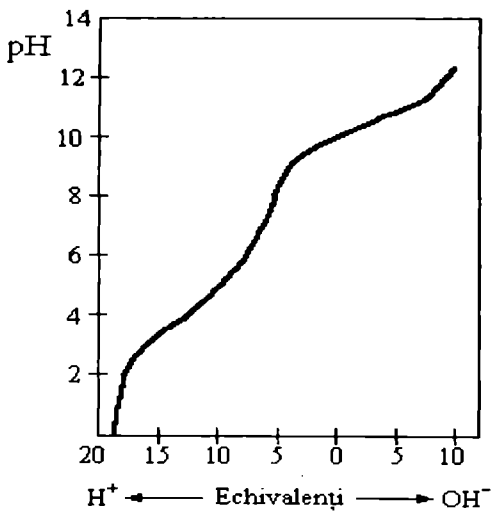


Fig.IV.16 – Titrarea ribonucleazei

Complexitatea lor rezidă în numărul şi varietatea grupelor polare ionizabile din moleculă. Grupele amino şi carboxil au o contribuţie substanţială în procesul titrării. Grupele tiolice, prezente adesea într-un număr mic, influenţează puţin alura curbei în schimb grupa fenolică a restului de tirozină din proteinele cu un conţinut mai bogat în acest aminoacid, are un efect pronunţat asupra rezultatelor.

Prin comportarea sa, fiecare grupă ionizabilă îşi aduce contribuţia, mai mare sau mai mică, în procesul titrării. În tabelul IV.7, sunt date valorile pK ale principalelor grupe ionizabile care participă la titrare.

Aceste valori pentru pK se găsesc în proteine şi sunt puţin deplasate faţă de valorile pK ale aminoacizilor individuali corespunzători, liberi.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabelul IV.7 – Valorile pK pentru grupele acide şi bazice din proteine

Nr. crt.	Grupa	În structura restului de aminoacid:	pK_a la 25°C
1	α-COOH	C-terminal	3,0 - 3,2
2	β-COOH	Aspartic	3,0 - 4,7
3	γ-COOH	Glutamic	~ 4,4
4	Imidazoliu	Histidină	5,6 - 7,0
5	α-NH_2	N-terminal	7,6 - 8,4
6	ε-NH_2	Lisină	9,4 - 10,6
7	H_2N-C(=NH)-NH- guanidiniu	Arginină	11,6 - 12,6
8	-OH	Tirozină	9,8 - 10,4
9	-SH	Cisteină	~ 8-9

Curbele de titrare ale proteinelor sunt de aceea mai complicate decât curbele aminoacizilor individuali care le compun, apărând ca o rezultantă a acţiunii lor. În fig. IV.16 se constată acest lucru.

C.Acţiunea tampon. Numeroasele grupe funcţionale ionizabile cu caracter acid sau bazic, având constantele pK diferite de la caz la caz, conferă proteinelor proprietăţi tampon pe toată scala de pH. Din fig.IV.16, unde curba de titrare are o înclinare mare faţă de ordonată, se observă foarte bine acest lucru. La adăugarea unor cantităţi importante de acizi sau baze, variaţiile pH-ului suferă modificări relativ mici.

Grupa imidazoliu din histidină este singura care are capacitatea de tamponare în apropierea pH-ului fiziologic, fapt pentru care îi revine un rol deosebit în acţiunea tampon a proteinelor în organism.

Acţiunea tampon în sânge, celule şi ţesuturi revine cu precădere proteinelor, acţiune care condiţionează desfăşurarea proceselor vitale şi funcţionarea normală a organismului. Orice dereglare a capacităţii de tamponare, care determină situarea pH-ului sanguin în afara limitelor normale (pH=7,3-7,5), poate duce la stările patologice cunoscute sub denumirile de "acidoză" şi "alcaloză".

IV.3.4. Proprietăţile optice ale proteinelor

Întrucât proteinele sunt formate din aminoacizi optic activi (cu excepţia glicinei), soluţiile lor apoase prezintă activitate optică. Semnul şi mărimea rotaţiei optice depind nu numai de atomii şi grupele de atomi ataşaţi atomilor de carbon asimetrici, dar şi de interacţiile atomilor de carbon asimetrici cu alţi atomi.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În cazul proteinelor cu structuri helicoidale, activitatea optică, în afară de cea generată de atomii de carbon asimetrici, se datorează şi disimetriei generale a structurii moleculare. Intervine aici activitatea optică fără carbon asimetric. În acest caz, disimetria este dată de sensul helixului, de dreapta sau de stânga (chiralitate elicoidală). Disimetria totală a moleculei include asimetria dată de carbonii asimetrici şi cea dată de spirala α-helixului. Modificările structurale sau conformaționale din moleculele proteinelor se reflectă în rotația optică specifică.

Pentru proteine, rotația optică specifică este levogiră. Sunt însă unele proteine ca hemoglobina, nucleoproteinele etc., care în soluții apoase sunt dextrogire, deoarece componenta lor prostetică are o activitate optică dextrogiră mai puternică decât cea levogiră a componentei proteice. În cazul proteinelor globulare, valoarea rotației optice se încadrează frecvent între -30^{o} şi -60^{o}.

Un factor important al modificării rotației optice specifice a proteinelor îl constituie denaturarea. La valori de pH mai mici sau mai mari față de pH_i, unde intervine denaturarea proteinelor, levorotația devine mai accentuată.

Starea ionică a moleculelor proteice influențează puțin sau nu influențează deloc rotația optică. Creşterea rotației optice negative se produce şi sub influența temperaturilor relativ ridicate, când este afectată conformația, fără distrugerea structurii primare.

Fenomenul creşterii levorotației la proteine cu denaturarea a fost studiat de Doty şi colaboratorii săi, care constată pe modelele polipeptidice sintetice că, atunci când astfel de compuşi în forma lor structurală α-helix sunt transformați, trecând într-un aranjament dezordonat, randomizat, devin mai levogiri. Se înțelege că puterea rotatorie a proteinelor poate fi utilizată ca un indiciu pentru integritatea sau degradarea moleculară.

IV.3.5. Absorbții caracteristice în ultraviolet şi vizibil

Toate proteinele dau absorbții maxime caracteristice în UV la λ=280nm. Această proprietate se datorează prezenței în proteine, în principal a tirozinei şi triptofanului, care absorb caracteristic la 280nm. Valoarea caracteristică a acestei absorbții serveşte la determinarea cantitativă a proteinelor prin metoda spectrofotometrică.

Unele heteroproteine care au grupa prostetică colorată (cloroplastina, hemoglobina etc.) dau spectre de absorbție în vizibil, putând fi determinate şi prin metoda fotocolorimetrică.

IV.3.6. Proprietăți chimice

IV.3.6.1. Reacții comune

Macromoleculele proteice, fiind alcătuite din aminoacizi, este de aşteptat ca o serie de proprietăți chimice întâlnite la aminoacizi şi peptide să se manifeste şi la proteine. Numeroase reacții chimice sunt generate de grupele amino- şi carboxil- terminale, de grupele funcționale aparținând resturilor de aminoacizi şi de grupele peptidice din lanțul proteic.

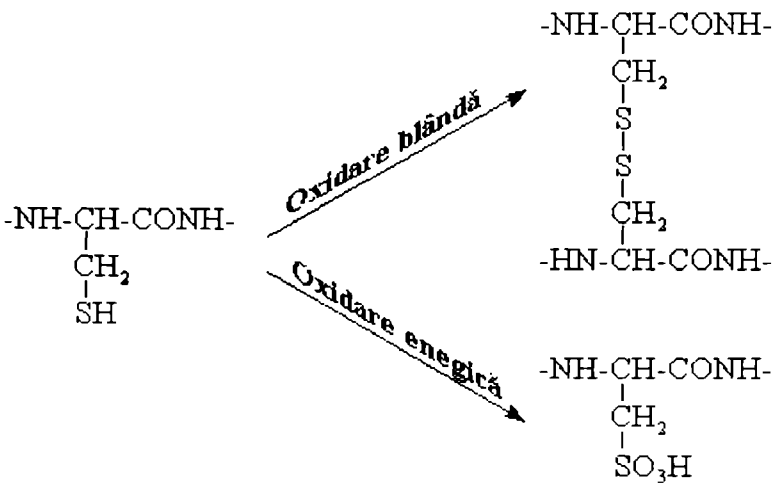
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

A.Grupele amino dau reacții de alchilare cu derivații halogenați, cu diazometanul și cu dimetilsulfatul. Dau reacții de acilare cu clorurile acide, anhidridele acizilor carboxilici și cu cetenele. Cu acidul azotos, grupa amină primară din proteine se transformă în hidroxil, iar în mediu acid se salifiază. Grupele amino- libere reacționează cu 2,4-dinitrofluorbenzenul, clorura de dansil, izotiocianatul de fenil, ducând respectiv, la 2,4-dinitrofenil-, dansil- și feniltiocarbamoil-derivații proteinei asupra căreia se acționează. Cu compușii carbonilici, grupa amino- liberă dă derivați hidroxilici, prin adiție sau compuși de tip baze Schiff, prin condensare, cu eliminare de apă.

Reacția cu ninhidrina, pe care o prezintă aminoacizii, peptidele și chiar aminele primare alifatice, este pozitivă și pentru proteine.

B.Grupele carboxilice libere formează săruri cu hidroxizii și carbonații alcalini. Cu alcooli, în mediu acid, formează esteri (de exemplu, cu metanolul), iar cu unii agenți reducători (de exemplu, $NaBH_4$) se transformă în grupe hidroxilice (alcooli primari, paragraful III.3.1.1.3).

C.Grupa tiolică este transformată cu ușurință în disulfură (-S-S-) de către oxidanții slabi și în acid sulfonic ($-SO_3H$) de oxidanții enegici:



Prin grupa tiolică, proteinele care conțin cisteină pot reacționa cu 2,4-dinitrofluorbenzenul, iar în prezența ionilor metalelor grele formează săruri insolubile (precipitate).

Când grupa tiolică este blocată în formă de tioeter, ca in metionină, aceasta reacționează specific cu bromcianul, eliminându-se ca tiocianat de metil, iar lanțul proteic se rupe exact în dreptul legăturii peptidice, la care restul metioninei participă prin grupa lui carboxilică (paragraful III.3.1.1.4).

D.Grupele hidroxilice din resturile serinei, treoninei și tirozinei dau reacții de alchilare cu derivații halogenați (de exemplu, CH_3I), diazometanul și dimetilsulfatul, iar cu clorurile acizilor carboxilici, anhidridele acestor acizi și cetenele dau reacții de acilare, formând esteri.

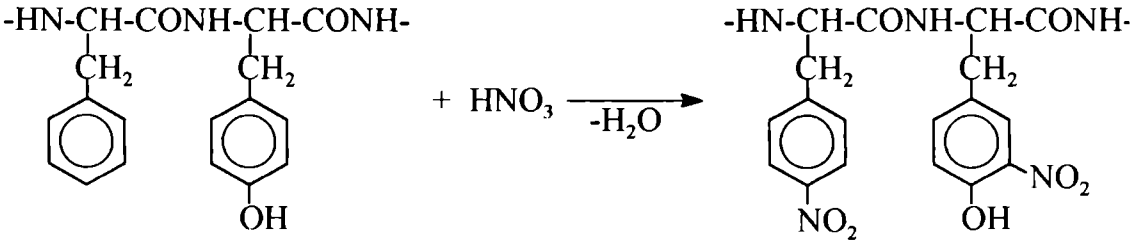
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

E.Grupele amidice din resturile asparaginei şi glutaminei şi grupele peptidice din lanţul proteic dau reacţia de hidroliză în mediile acide, bazice şi enzimatice. Grupele peptidice mai reacţionează şi cu hidrazina (reacţia Akabori), care transformă toate resturile aminoacizilor din secvenţa lanţului proteic în aminoacilhidrazide, cu excepţia C-acidului, care rămâne ca aminoacid liber (paragraful III.3.1.1.3).

IV.3.6.2. Reacţii de culoare

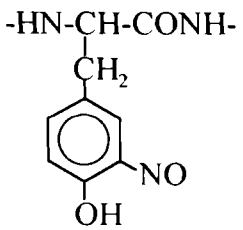
Reacţiile de culoare date de substanţele proteice, se datoresc prezenţei unor aminoacizi în moleculă, prezenţei grupelor peptidice şi a unor grupe funcţionale libere din radicalii R ai resturilor de aminoacizi. În multe cazuri, reacţiile de culoare pot servi la identificarea şi dozarea proteinelor.

A.Reacţia xantoproteică. O soluţie proteică tratată cu acid azotic concentrat dă o coloraţie galbenă, care prin tratare cu soluţie de hidroxid de amoniu, devine portocalie. Reacţia este determinată de resturile aminoacizilor cu caracter aromatic sau heterociclic cu caracter aromatic, care formează nitroderivaţi.



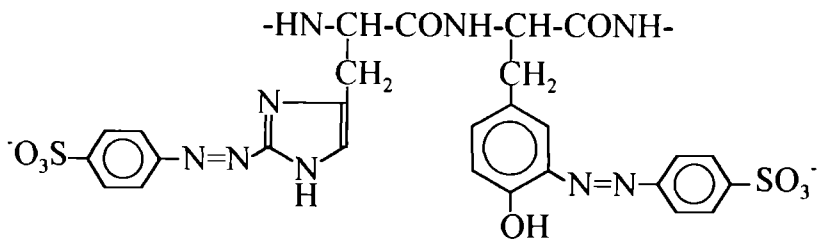
Proteinele care nu conţin astfel de aminoacizi nu dau aceste reacţii.

B.Reacţia Millon. Prin tratarea la cald a unei proteine, cu o soluţie de azotat de mercur în acid azotic, la care s-a adăugat şi puţin azotit de sodiu, se formează un precipitat roz sau o soluţie roz, ca urmare a nitrozării nucleului fenolic al restului de tirozină.



Proteinele care nu conţin in structură tirozina, nu dau reacţia Millon.

C.Reacţia Pauly. Nucleul imidazolic al histidinei şi cel fenolic al tirozinei din structura proteinelor cuplează cu sarea de diazoniu a acidului sulfanilic, ducând la derivaţii azoici corespunzători, de culoare roşie-vişinie.

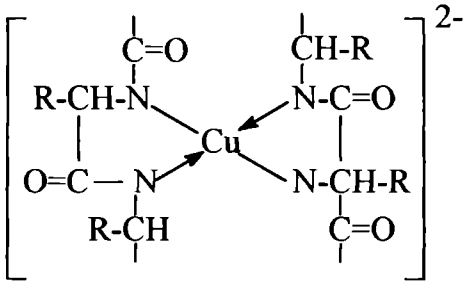


https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

D.Reacția cu ninhidrina. Reacția pe care o dau aminoacizii şi peptidele cu ninhidrina este caracteristică şi proteinelor, datorită grupelor aminice primare libere din structură. Astfel, proteinele tratate cu o soluție de ninhidrină dau o colorație albastră. Reacția este accelerată prin încălzire (paragraful II.3.2).

E.Reacția biuretului. Ca şi peptidele (începând cu tripeptidele), proteinele reacționează cu sulfatul de cupru în mediu bazic, formând combinații complexe albastru-violete sau violete.

Practic, sulfatul de cupru în mediu bazic formează hidroxidul de cupru divalent, care în prezența substanțelor proteice se colorează în albastru-violet sau violet, structura complexului format fiind următoarea:



Complex proteină - Cu^{2+}

F.Reacția cu nitroprusiatul de sodiu. Proteinele care conțin grupe tiolice (-SH) libere în moleculă, dau prin tratare cu nitroprusiatul de sodiu, $Na_2[Fe(CN)_5(NO)]$, în soluție amoniacală, o colorație roşie.

G.Reacția Sakaguchi. Substanțele proteice, împreună cu α-naftolul şi hipocloritul (sau hipobromitul) de sodiu, în mediu bazic, dau o colorație roşie-carmin. Reacția este caracteristică resturilor argininei, datorită prezenței grupei guanidinice.

H.Reacția Adamkievicz-Hopkins. Proteinele dau cu o soluție apoasă de acid glioxilic sau cu acid acetic glacial impur (conține urme de acid glioxilic), la încălzire cu acid sulfuric concentrat, o colorație violetă.

I.Reacția sulfurii de plumb. Prin tratarea unei soluții proteice cu acetat sau azotat de plumb, în mediu bazic la fierbere, se formează un precipitat negru de sulfură de plumb. Reactia este caracteristică aminoacizilor cu sulf (cisteină, cistină şi metionină). Aceşti aminoacizi, prin degradare în condițiile menționate, formează H_2S, care întâlneşte ionul Pb^{2+}, precipitând sulfura de plumb, de culoare neagră.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

IV.3.7. Proprietățile biochimice ale proteinelor

Proprietățile funcționale specifice ale proteinelor sunt o reflectare directă a structurii lor de ansamblu, deosebit de complexe. Grupe mari de proteine îndeplinesc funcții catalitice (enzimele), hormonale (hormonii de natură proteică), de transport, contractile, de apărare (anticorpii) etc.

Datorită faptului că enzimele şi hormonii formează capitole separate, iar celelalte proteine având diverse funcții biologice sunt integrate corespunzător în alte capitole, în cele ce urmează se vor face referiri numai la proprietățile imunologice ale proteinelor. Acestea sunt o formă de manifestare a specificității substanțelor proteice şi se concretizează prin reacția antigen-anticorp:

$$\underset{\text{(Antigen)}}{\text{Atg}} + \underset{\text{(Anticorp)}}{\text{Atc}} \rightleftharpoons \underset{\text{(Complex antigen-anticorp)}}{\text{Atg} - \text{Atc}}$$

•Prin **antigen** se înțelege o substanță care introdusă în organismul unui animal prin sânge şi limfă, declanşează biosinteza unor proteine cu funcție de apărare numite anticorpi, cu care reacționează specific, formând un complex antigen-anticorp. Antigenii sunt, în general, substanțe de natură proteică, însă mai pot juca rol de antigeni şi unele poliglucide, anumite lipide sau asociații complexe obținute prin combinarea lor (glicolipide).

O serie de substanțe numite haptene sau antigene incomplete, reacționează cu anticorpii, dar nu au capacitatea să inducă producerea lor. Haptenele au structuri relativ simple (de exemplu, compuşi de tip sterolic, liberine, prostaglandine, tironine, unele medicamente etc.). Ele dobândesc caracter de antigeni numai prin legarea la o proteină purtătoare. Asociația proteină-haptenă se numeşte antigenă conjugată.

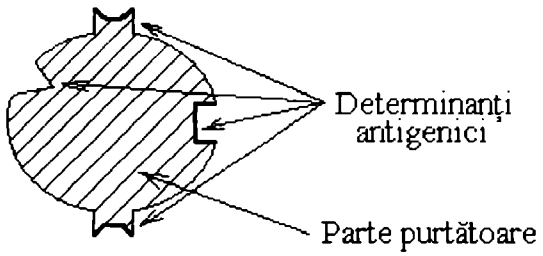
O substanță poate juca rol de antigen, numai dacă este străină de organismul animal în care a pătruns şi dacă prezintă un anumit grad de complexitate structurală şi dimensiuni corespunzătoare.

Oricare substanță de origine animală nu produce anticorpi în condiții normale, în organismul din care provine. Aceasta, pentru că în dezvoltarea sistemului imunitar, se creează o toleranță față de structurile proprii ale organismului.

Caracterul de antigen este cu atât mai pronunțat, cu cât organismele din care provin aceste substanțe sunt mai îndepărtate taxonomic, față de animalul de experiență. Gradul de complexitate structurală este o condiție importantă pentru antigenicitate. Se cunosc cazuri de proteine cu structură mai simplă ca: gelatina, protamina şi unele polipeptide sintetice, care au putere antigenică slabă.

Molecula unui antigen este formată din mai multe regiuni de combinare (cel puțin două), numite determinanți antigenici sau epitopi, reprezentate prin secvențe de grupe chimice capabile să interacționeze cu anticorpii şi, o parte a moleculei, având rol de purtător al determinanților antigenici.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Numărul determinaților antigenici este egal cu numărul moleculelor de anticorpi cu care poate interacționa o moleculă de antigen şi este considerat ca "valența" antigenului. Antigenii sunt deci polivalenți.

•**Anticorpii** sunt substanțe de natură proteică, elaborați de organismul animal, ca urmare a pătrunderii unor agenți patogeni în limfă şi sânge şi au capacitatea de a reactiona specific cu antigenii, care au provocat producerea lor. Anticorpii se produc în sistemul limfoid al vertebratelor, la nivelul celulelor limfoidoplasmocitare producătoare de globuline, ca urmare a stimulului specific indus de prezența antigenului.

Anticorpii sunt proteine din categoria gamaglobulinelor, însă nu toate gamaglobulinele sunt anticorpi. Dintre gamaglobuline, numai imunoglobulinele îndeplinesc însuşirile de anticorpi.

Imunoglobulinele specifice (anticorpii) față de un antigen, reprezintă un grup heterogen, care au în comun: locul de biosinteză (sistemul limfoid al vertrebatelor), structura chimică, conținutul în glucide, constanta de sedimentare, durate de viață etc.

Prin metode deosebit de sensibile şi eficiente ca electroforeza, combinată cu ultracentrifugarea, precum şi alte tehnici speciale, au fost identificate cinci clase de imunoglobuline, dintre care primele două au mai multe subclase şi anume:

1) IgG, cu subclasele: IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4
2) IgA, cu subclasele: IgA_1, IgA_2
3) IgM
4) IgD
5) IgE

Dintre toate acestea, numai imunoglobulinele IgG pot trece prin placentă, asigurând necesarul de anticorpi fătului, în timpul vieții intrauterine.

Elaborarea anticorpilor, a acestor proteine de apărare, condiționată de existența unor stimuli antigenici, constituie răspunsul imun, prin care organismul se apără împotriva unor factori nocivi, care acționează ca antigeni. În multe cazuri, acționează ca antigeni proteinele produse de bacterii (toxine bacteriene) sau componente care provin din bacterii sau viruşi, prin dezagregarea lor. Sunt şi situații în care agenții patogeni produc efecte nocive, caracterizate prin hipersensibilizare, ca reacții alegice, reacții de rejecție a homogrefelor etc.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Prezența anticorpilor un timp îndelungat în organismul animal constituie starea de imunitate față de agenții patogeni care au indus producerea lor. Durata imunizării este însă variabilă în funcție de natura agentului patogen. Astfel, dacă imunitatea față de boli infecțioase ca: variola, rubeola, tusea convulsivă etc. se menține pe tot parcursul vieții, imunitatea față de virușii gripali durează de la câteva săptămâni la câteva luni.

De asemenea, reacția antigen-anticorp este răspunzătoare și de apariția fenomenului de respingere în cazul transplantelor de organe. De aceea, transplantele se recomandă să fie făcute între indivizi cât mai înrudiți genetic. Imunosupresoarele administrate înaintea operației de transplant pot suprima temporar fenomenul de respingere; după un timp însă, în sângele pacientului încep să apară din nou anticorpi specifici, care pot determina fenomenul de respingere a organului transplantat după o perioadă de timp (luni sau ani) de la efectuarea transplantului.

Din punct de vedere practic, imunitatea față de o boală infecțioasă se realizează prin injectarea animalului (sau omului) cu cantități foarte mici de compuși macromoleculari cu proprietăți antigenice, obținuți prin dezagregarea microorganismului patogen sau virus.

Atunci când, după producerea stării de imunitate microorganismul provocator pătrunde din nou în sânge și limfă, anticorpii specifici, corespondenți, pot să-i anihileze activitatea sau să-l distrugă, combinându-se cu constituenții săi antigenici.

Această stare de imunizare reflectă funcția de apărare a imunoglobulinelor împotriva agenților patogeni, favorabilă organismului animal. După cum s-a constatat, în cursul dezvoltării sistemului imunitar al organismelor animale, se creează o toleranță față de toate structurile proprii. Dacă, întâmplător se produc unele modificări în structura acestor substanțe, ele devin autoantigene, capabile să inducă producerea de autoanticorpi sau, dacă intervin unele dereglări in sistemul imunitar, toleranța față de structurile proprii, naturale încetează, declanșând o boală autoimună. Sistemul imunitar pierde, în acest caz, capacitatea de a discrimina între componentele propriului organism și cele străine lui.

Prin acțiunea lor, anticorpii produc o serie de boli autoimune, printre care:

-Anemiile autoimune. Sunt determinate de autoanticorpii anti-eritrocitari și pot apărea ca boli primare sau secundare unor afecțiuni ca: tumori ale țesutului limfoid, pneumonii atipice etc. În cazul unor infecții bacteriene sau parazitare, antigenul se poate atașa sau parazita eritrocitul, astfel încât anticorpii formați față de antigenul infecțios pot liza consecutiv și hematia.

-Anemia perinicioasă (anemia Biermer). Autoanticorpii blochează factorul intrinsec. Acest factor este o glicoproteină biosintetizată de mucoasa gastrică și formează un complex cu vitamina B_{12}, foarte important, pentru că numai în această formă, vitamina se absoarbe la nivelul intestinului, pentru a fi transportată în organism. Prin blocarea factorului intrinsec se blochează și absorbția vitaminei B_{12} la nivel intestinal, determinând prin aceasta apariția anemiei perinicioase.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

-Lupus eritematos diseminat (LED). Este o boală autoimună din categoria bolilor de colagen ce se manifestă prin leziuni degenerative de tipul necrozei fibrinoide a țesutului conjunctiv, cu precădere la nivelul vaselor mici. Boala este sistemică, afectează multe organe, cu precădere rinichii, splina, pielea, articulațiile, aparatul cardiovascular, provocând în același timp multe anomalii ale funcției imune.

-Artrita reumatoidă (poliartrita cronică evolutivă). Este o boală cronică inflamatorie a țesutului conjunctiv, care se produce printr-un mecanism autoimun. Afectează în primul rând femeile. Are o simptomatologie clinică asemănătoare bolilor sistemice, cu stare generală alterată, febră, anemie, pierdere în greutate, mărirea ganglionilor limfatici etc. Cei care suferă de această boală prezintă tumefiere și hiperemie a membranei sinoviale la articulațiile afectate, precum și leziuni caracteristice, cum sunt nodulii subcutanați, care au o structură granulomatoasă. Ca fenomene comune mai pot fi menționate: distrofia fibrinoidă, conglomerat de plasmocite, macrofage și limfocite, leziuni ale țesutului conjunctiv din inimă, vase etc. În serul bolnavului este prezent factorul reumatoid și, uneori, chiar factorul antinuclear.

În ce privește afectarea sistemului imunitar, o problemă relativ recentă o constituie boala SIDA – sindromul imunodeficienței dobândite. Boala a fost diagnosticată în vara anului 1981 și supusă încă de atunci unor cercetări de mare anvergură, prin care s-au acumulat foarte multe cunoștințe. S-a descoperit virusul purtător, H.I.V. (virusul imunodeficienței umane), căile de transmitere a bolii (în principal, contactul sexual), formele ei de manifestare, nivelul la care acționează, consecințele studiilor evoluției etc., însă nu s-a găsit până acum nici un tratament eficient cu medicamente sau vaccin. S-au identificat unele medicamente care ameliorează numai parțial starea sănătății, fără a eradica maladia. Unul dintre aceste medicamente este azidatimidina (AZT), care reduce infecția și răspândirea SIDA, prin inhibarea dezvoltării retrovirusului în interiorul celulei.

Ținta atacului retrovirusului HIV o constituie limfocitele, sediul biosintezei anticorpilor, pe care le distruge treptat, lăsând organismul gazdă pradă tuturor agenților patogeni. În această situație pot pune viața în dificultate chiar și agenții patogeni care în condiții normale nu prezintă nici un pericol major.

Structura anticorpilor. Ca trăsătură structurală caracteristică, anticorpii au situsuri de legătură specifice, numite situsuri de combinare sau paratopi. Acestea sunt complementare geometriei determinanților antigenici, numiți și epitopi, existenți pe molecula antigenului corespondent. Fiecare moleculă de anticorp are, de regulă, două situsuri de legătură cu aceeași specificitate (regiunea variabilă). Molecula unui anticorp are în componență patru subunități, dintre care două catene polipeptidice grele (H), cu masa de 50-70KDa și două catene polipeptidice ușoare (L), cu masa moleculară de 20KDa (fig.IV.17).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

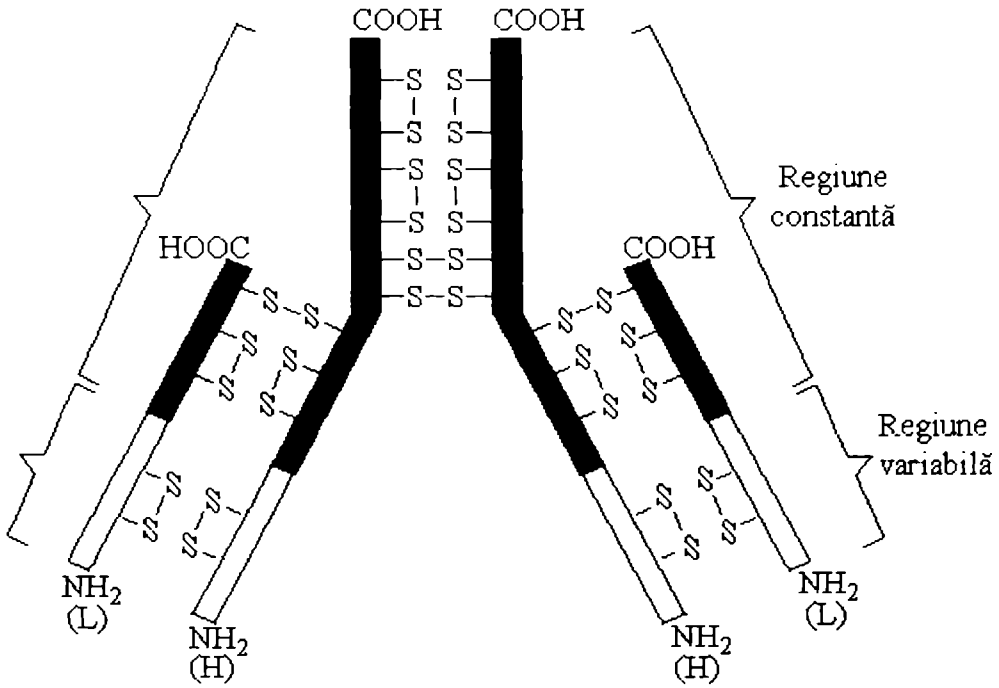


Fig.IV.17 – Reprezentarea schematică a structurii anticorpilor

Fiecare catenă uşoară interacţionează specific cu perechea ei grea, în cadrul unui aranjament simetric. Segmentele catenare înnegrite formează regiunile comune diferiţilor anticorpi, iar porţiunile extreme ale catenelor uşoare şi grele, albe, terminate prin grupe aminice, au configuraţii variabile, de la un anticorp la altul şi reprezintă locul de conjugare al anticorpilor.

Astfel, este posibil ca prin reacţia antigen-anticorp să se formeze un complex antigen-anticorp solid şi inactiv, sub formă de reţea tridimensională, numit precipitat imun (fig.IV.18).

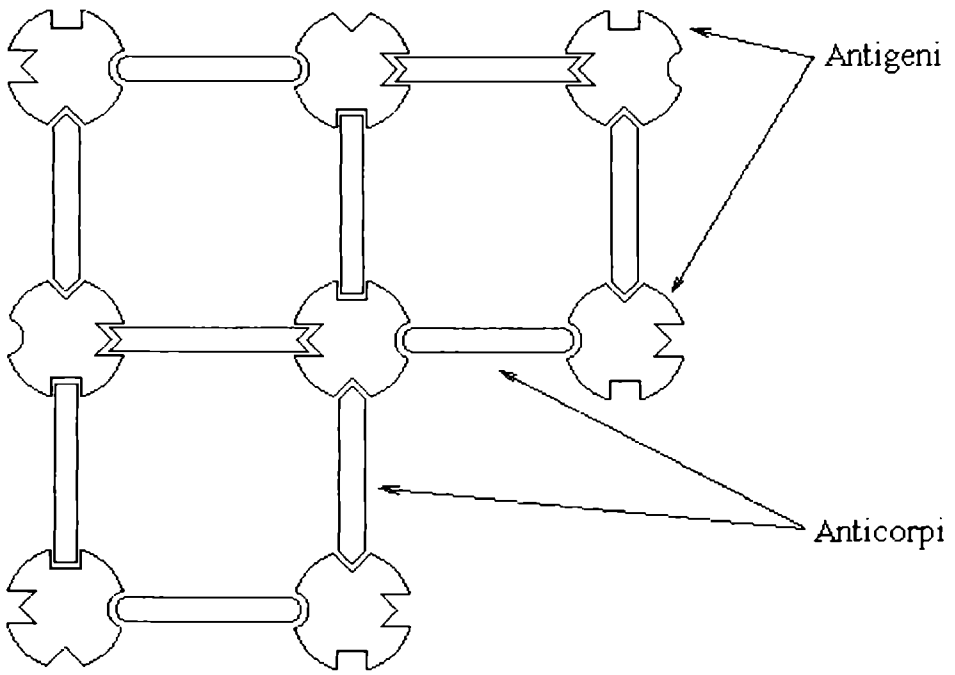


Fig.IV.18 – Reprezentarea schematică a precipitatului imun

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Factorul primordial în reacția de imunizare este complementaritatea sterică dintre epitopi şi paratopi. Procesul de asociere între antigen şi anticorp implică legături de tip necovalent, slabe, nespecifice (legături de hidrogen, legături prin forțe van der Waals şi legături ionice) între grupele chimice existente în epitopi şi cele din paratopi.

Reacția de formare a complexului antigen-anticorp este reversibilă:

$$Atg + Atc \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} Atg - Atc$$

Constanta de echilibru (k) a reacției este:

$$k = \frac{[Atg - Atc]}{[Atg][Atc]}$$

Matematic, se constată că prin creşterea concentrației de antigen (sau anticorp) de la numitor, valoarea constantei de echilibru scade. Se inhibă astfel, formarea complexului Atg–Atc, determinând un aspect de patologie biochimică imunitară.

Semnificația constantei de echilibru în acest caz, relevă (la nivel molecular) afinitatea dintre epitop şi paratop, care, structural, trebuie să fie complementari.

Un complex antigen-anticorp insolubil se formează în cazul echivalenței dintre antigenii şi anticorpii participanți la reacție. Când antigenii sau anticorpii se află în exces, se formează un complex solubil, insuficient pentru a fi eficace.

Această asociere, dependentă strict de complementaritatea sterică dintre epitop şi paratop şi de interacțiile menționate, determină într-un anumit grad eliminarea apei din imediata vecinătate a grupelor nepolare şi asigură stabilitatea complexului antigen-anticorp.

Eliminarea apei conferă complexului un nivel energetic mai scăzut şi deci o mai mare stabilitate.

Toate aceste forțe acționează mai intens, cu cât antigenul se potriveşte steric mai bine şi se apropie mai mult de situsul de legătură al anticorpului. S-a constatat că, pentru formarea complexului antigen-anticorp, este necesar ca antigenul şi anticorpul să se apropie la o distanță de 0,1-0,2nm şi că o nepotrivire sterică poate împiedica stabilirea legăturilor chiar şi în cazul unor forțe de atracție puternice.

Reacția antigen-anticorp, caracterizată printr-o specificitate deosebită, pe lângă importanța covârşitoare pe care o are în crearea stării de imunitate, îşi găseşte valoroase aplicații analitice ca: diferențierea proteinelor între ele, identificarea şi testarea purității lor, anticorpii dovedindu-se în aceste situații reactivii cei mai specifici.

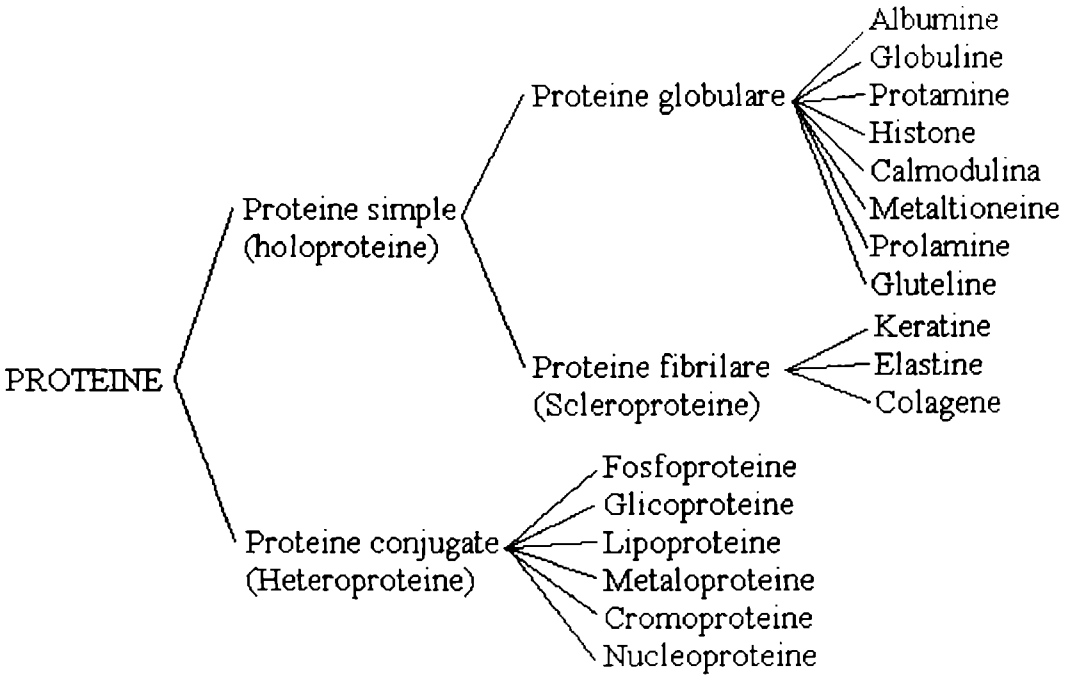
O aplicație deosebită în practica de cercetare biocimică o constituie utilizarea partenerilor de reacție, antigenii şi anticorpii, în cromatografia de afinitate.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

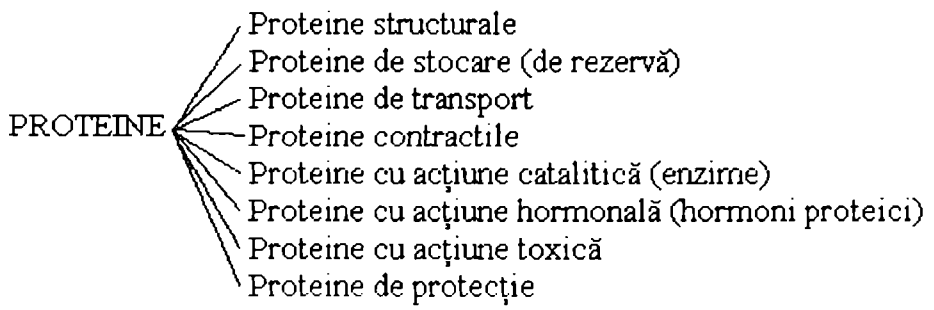
IV.4. Clasificarea proteinelor

Pentru clasificarea proteinelor trebuie să se țină seama în primul rând de structură, de unele proprietăți şi de funcțiile lor biologice.

a)Clasificarea proteinelor după criterii structurale şi proprietăți



b)Clasificarea proteinelor după funcția biologică



IV.5. Proteine simple (holoproteine)

Proteinele simple sau holoproteinele sunt substanțe macromoleculare, care, prin hidroliză totală conduc exclusiv la un amestec de aminoacizi. În cele ce urmează vor fi prezentate principalele tipuri de proteine globulare şi fibrilare, de origine animală şi vegetală, cu caracteristicile lor mai importante.

IV.5.1. Proteine globulare

Proteinele globulare (sau proteinele solubile) au forma ovală, cilindrică sau sferică, sunt solubile în apă şi în medii apoase conținând săruri, acizi sau baze şi sunt sensibile față de agenții denaturanți. Intră în componența multor substanțe fiziologic active, ca: enzimele, proteinele transportoare de oxigen, hormonii de natură proteică, anticorpii etc.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

A.Albumine. Albuminele au mase moleculare în jur de 60KDa, sunt solubile în apă şi precipită din soluţie prin saturare (peste 50%) cu sulfaţi de: amoniu, sodiu sau magneziu. Au mobilitate electroforetică mare şi punctul izoelectric în domeniul slab acid (pH~5). La încălzire sau tratare cu alcool, coagulează.

Albuminele au în compoziţie un conţinut bogat în aminoacizi cu caracter acid şi acizi monoaminomonocarboxilici, cu excepţia glicinei, care poate fi în cantităţi mici sau absentă. Grupele ionizate de pe suprafaţa moleculelor, prin repulsiile electrostatice dintre ele, asigură o bună dispersie moleculară şi stabilitate în soluţie.

Albuminele se găsesc în organismele animale şi vegetale. În animale, sunt distribuie în citoplasmă şi lichidele biologice, îndeplinind diverse funcţii: participă la reglarea pH-ului sanguin, la menţinerea presiunii osmotice a serului sanguin, la transportul unor substanţe pe cale sanguină (acizi graşi, medicamente, anioni etc.) şi constituie rezerve de proteine.

Denumirea acestor proteine derivă de la originea lor. Astfel, avem: serum albumina, din serul sanguin; ovalbumina, din albuşul de ou; lactoalbumina, din lapte; mioalbumina, din ţesutul muscular etc. Din sângele fetal şi din sângele bolnavilor cu neoplasm hepatic a fost identificată α-fetoproteina, numită şi antigen carcinoembrionar, după localizarea şi rolul ei în carcinom.

În regnul vegetal albuminele sunt răspândite în toate organele plantelor, în special în seminţe, adesea fiind asociate cu globulinele, de care se pot separa prin diluare cu apă, pe baza diferenţei de solubilitate.

Printre albuminele vegetale se numără legumelina din seminţele plantelor leguminoase (soia, mazăre, linte) şi leucozina din seminţele cerealelor (grâu, ovăz, secară).

Sunt şi albumine vegetale cu acţiune toxică asupra organismului animal, numite toxalbumine. Toxicitatea lor se manifestă prin aglutinarea (aglomerarea) globulelor roşii din sânge. Acţiune toxică manifestă ricina din seminţele de ricin, soina din soia, falina din ciuperca Amanitha phalloides etc.

B.Globuline. Sunt proteine simple, cu mase moleculare cuprinse între 120-1300KDa. Au un conţinut mai ridicate de acizi monoaminodicarboxilici (care le imprimă un caracter acid), un conţinut mai ridicat de glicină şi leucină, dar sărac în aminoacizi cu sulf.

Punctul izoelectric al globulinelor se situează în domeniul neutru, fiind aproape de pH=7. Sunt insolubile în apă, dar solubile în soluţii diluate de acizi, baze sau săruri (NaCl, $(NH_4)_2SO_4$, Na_2SO_4). Solubilitatea lor este mai redusă decât a albuminelor, având în vedere că pe suprafaţa moleculelor există sarcini de semn contrar, care se atrag, favorizând agregarea şi nu dispersia în soluţie. Globulinele precipită prin tratare cu soluţie semisaturată de sulfat de amoniu (sub 50% saturare) sau prin diluare cu apă.

Globulinele sunt răspândite în organismele animale şi vegetale.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Printre principalele globuline de origine animală se află: α-, β- şi γ-serumglobulinele din serul sanguin, a căror heterogenitate s-a dovedit electroforetic, identificându-se subfracţiunile α_1-, α_2-globuline, β_1-, β_2-globuline şi γ-globuline; fibrinogenul din plasma sanguină; transferinele (pentru transportul fierului) şi ceruloplasmina (pentru transportul cuprului); şi imunoglobulinele sunt tot din categoria globulinelor sanguine; ovoglobulina din ou; lactoglobulina din lapte etc.

Exemple de globuline vegetale sunt: glicina din soia, vicilina din porumb, faseolina din fasole, legumina din legume, amandina din migdale, edestina din seminţele de cânepă etc. În seminţele plantelor aceste proteine au rol de substanţe de rezervă.

Multe globuline se obţin din tesuturile animale şi din plante, prin extracţie cu soluţie de clorură de sodiu de concentraţie 5-10% şi precipitarea extractului prin diluare cu apă.

C.Protamine. Protaminele formează o grupă de proteine cu caracter bazic pronunţat, datorită conţinutului mare de acizi diaminomonocarboxilici (cca. 80%) în moleculă. Termenii grupei au mase moleculare relativ mici, în jur de 5KDa, structură simplă şi o slabă varietate de aminoacizi. Nu coagulează la încălzire, dar precipită alte proteine din soluţie. Protaminele se dizolvă în apă, soluţii de acizi sau baze şi în amoniac. Sunt componente ale nucleoproteinelor, unde prin caracterul lor bazic, se află asociate cu acizii nucleici. Sunt proteine de origine animală, hidrolizează în mediu acid, bazic şi sub acţiunea proteazelor, cu excepţia pepsinei.

Celulele spermatice de peşte constituie un bogat material în protamine, din care se extrag diverşi reprezentanţi ai grupei şi anume: salmina (din somon), clupeina (din hering), sturina (din nisetru) şi ciprina (din crap).

Sunt şi cazuri când în cromatina celulelor spermatice, in locul histonelor se află protamine asociate cu acizii nucleici, formând nucleoproteine specifice (nucleoprotamine).

D.Histone. Sunt proteine cu caracter bazic. Au un conţinut de 20-30% acizi diaminomonocarboxilici (Lys, Arg şi His), deci mai sărac decât în protamine, care imprimă o bazicitate mai slabă decât a acestora. Au mase moleculare cuprinse între 10 şi 20KDa şi o structură moleculară mai complicată decât protaminele. Sunt solubile în apă, soluţii diluate de acizi sau baze şi insolubile în amoniac. Histonele au punctul izoelectric în mediu bazic, la pH~10, coagulează la încălzire sub acţiunea electroliţilor şi precipită alte proteine din soluţie.

Fiind proteine cu caracter bazic, histonele se găsesc adesea asociate cu acizii nucleici (ADN) sub formă de nucleoproteine, fiind implicate în reglarea activităţii genelor. În stare liberă, se întâlnesc în leucocite, sperma peştilor etc.

Stabilirea structurii histonelor a întâmpinat dificultăţi din cauza heterogenităţii lor, fiind amestecuri de proteine bazice, cu proprietăţi asemănătoare.Totuşi, prin izolarea lor din diverse celule şi o cercetare eficientă, s-au evidenţiat cinci tipuri distincte de histone, prin conţinutul ridicat de lisină sau arginină şi prin mobilitatea electroforetică. Acestea sunt:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

-H_1, histone cu un conținut ridicat în lisină;

-H_2A și H_2B, histone având conținut moderat în lisină;

-H_3 și H_4, histone cu un conținut crescut în arginină.

Histonele H_1 corespund masei moleculare de 23KDa și se găsesc de două ori mai puțin cantitativ decât alte histone.

Celelalte histone (H_2A, H_2B, H_3 și H_4) au mase moleculare în domeniul 11-15KDa, tind să se combine între ele și cu ADN și se află frecvent în cromatină. Aminoacizii cu radicali hidrofobi sunt cuprinși în extermitatea C-terminală a lanțului proteic, permițând legarea histonelor între ele, iar aminoacizii bazici se plasează spre extremitatea N-terminală, care se combină cu ADN.

În plante se găsesc histone vegetale, înrudite cu histonele animale tipice, îndeplinind rol de componentă proteică a nucleoproteinelor și cromoproteinelor vegetale.

E.Prolamine (sau gliadine). Sunt proteine vegetale, întâlnite în semințele gramineelor, predominând în semințele cerealelor. Dețin în compoziție cantități însemnate de prolină și de acizi monoaminodicarboxilici, care le imprimă caracter acid pronunțat. Denumirea de prolamine derivă de la conținutul bogat în prolină, iar aceea de gliadine provine de la gliadină, prolamina principală din boabele de grâu.

Prolaminele sunt insolubile în apă, greu solubile în soluții alcaline diluate, alcool etilic absolut, alcool metilic, alcool propilic etc. Separarea prolaminelor de alte proteine din amestec este avantajată de solubilitatea lor specifică în alcool etilic 70%.

Prolaminele nu coagulează la încălzire. Au caracter acid, datorită unui conținut ridicat în prolină, acid aspartic și acid glutamic.

Conținutul sărac în lisină și triptofan – aminoacizi esențiali – situează prolaminele printre proteinele cu valoare nutritivă slabă.

Ca principali reprezentanți ai prolaminelor se evidențiază gliadina din boabele de grâu și secară, hordeina din boabele de orz, zeina din boabele de porumb, aveina din boabele de ovăz și cafirina din semințele de sorg.

F.Gluteline. Sunt proteine de origine vegetală. Se găsesc în diverse organe de plante, în special în citoplasma frunzelor verzi și în semințele cerealelor, însoțite de prolamine. Conținutul bogat în acizi monoaminodicarboxilici imprimă acestor proteine un caracter acid pronunțat.

Glutelinele sunt solubile în soluții alcaline diluate, iar prin acidularea soluției precipită. Glutelinele nu sunt solubile în apă, alcool etilic și soluții de săruri.

Valoarea nutritivă a glutelinelor este superioară prolaminelor, fiind mai bogate în aminoacizi esențiali. Ca reprezentanți mai importanți ai grupei se remarcă glutenina din boabele de grâu și orizeina din boabele de orez.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În făina panificabilă de grâu şi secară se găseşte glutenul, un amestec de proteine, glucide, lipide şi săruri minerale, care îi conferă însuşiri de panificaţie. În proteinele din gluten predomină glutelinele, prolaminele, globulinele şi albuminele vegetale. Mai exact, glutenul din făină de grâu conţine: 40-50% prolamine şi gliadină; 6-10% globuline; 3-5% albumine; 6-7% amidon; 2-3% glucide solubile; 2-3% lipide şi 1-2% celuloză.

Glutenul se obţine cu uşurinţă prin frământarea făinei de grâu într-un curent continuu de apă.

Prin conţinutul de gliadină şi glutenină, făina de grâu formează cu apa un aluat lipicios, având proprietatea deosebită, unică, de a reţine dioxidul de carbon. Această proprietate are o importanţă remarcabilă în panificaţie, deoarece dioxidul de carbon rezultat în timpul dospirii se distribuie în toată masa aluatului, obţinându-se pâinea cu aspect buretos.

G.Calmodulina. Este o proteină monocatenară, având în secvenţă 148 aminoacizi şi masa moleculară de 16,7KDa. Se găseşte în toate organismele vegetale şi animale şi intervine în acţiunea ionului de calciu.

În compoziţia de aminoacizi, calmodulina nu are cisteină şi triptofan. Are un singur rest de histidină şi cantităţi mari de fenilalanină şi tirozină. In plus, mai conţine acizi monoaminodicarboxilici, care-i permit să fixeze în patru regiuni diferite din moleculă, patru ioni Ca^{2+}. În mediul celular, ionul Ca^{2+} are o concentraţie mică (10^{-8}-10^{-7}M) faţă de mediul extracelular, unde concentraţia este de 10^5 mai mare.

Calmodulina fixează ionul Ca^{2+} sub forma unui complex calmodulină-calciu, după formarea căruia conformaţia ei se modifică.

Această proteină joacă un rol deosebit de important in fenomenele biologice majore, ca: diviziunea celulară, glicogenoliza, deplasarea cromozomilor în timpul diviziunii, vehicularea calciului în celulă şi din celulă în spaţiul intercelular. Calmodulina mai intervine în activitatea unor enzime, ca protein-kinaza calciu dependentă, adenilatciclaza, fosfodiesteraza (pentru cAMP), ATP-aza Ca şi Mg dependente. Complexul calmodulină-calciu activează contracţia muşchilor netezi şi eliberarea substanţelor neurotransmiţătoare în terminaţiile fibrelor nervoase.

Activarea muşchilor striaţi şi a muşchiului cardiac nu se face prin complexul calmodulină-calciu, ci prin intermediul altei proteine care fixează calciul, troponina.

IV.5.2. Proteine fibrilare

Proteinele fibrilare, numite şi scleroproteine sunt substanţe organice de origine animală. Se găsesc cu precădere în ţesuturile de susţinere, piele, oase, unghii şi păr, având rol de susţinere, protecţie şi rezistenţă macanică. Aceste proteine au formă alungită, fibrilară şi se caracterizează printr-o deosebită rezistenţă mecanică, chimică şi faţă de enzimele proteolitice. Nu sunt solubile în apă, soluţii de săruri, acizi şi baze diluate.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tipurile principale de proteine fibrilare includ: keratinele, elastina, fibroina şi colagenul. Structura fiecăreia dintre ele este condiționată de compoziția în aminoacizi şi dispunerea lor în structura primară şi secundară.

Tabelul IV.8 – Compoziția în anumiți aminoacizi din unele scleroproteine (dată în g/100g proteină)

Aminoacizi / Proteina	Cisteină + cistină	Prolină	Hidroxi-prolină	Glicină	α-Alanină
Fibroina din mătase	0,18	0,59	--	42,6	34,37
Keratina din lână	11,3	7,3	--	5,1	3,7
Colagenul din os	urme	10,1	8,2	26,2	9,3

A.Keratinele. Sunt proteine de protecție, de origine animală, constituenți importanți în epidermă, păr, lână, unghii, copite, coarne, solzi, pene şi mătase. Aceste proteine sunt de două tipuri: α- şi β-keratine.

α-Keratinele au un conținut relativ bogat în resturi de cistină şi, în aceeaşi măsură, legături disulfurice. În rest, conțin majoritatea aminoacizilor curent întâlniți în proteine.

α-Keratinele includ proteinele dure, fragile, cu un continut de până la 22% cistină (din coarne şi unghii), dar şi proteine mai puțin dure şi mai flexibile, cu un conținut de 10-14% cistină, respectiv keratinele din păr şi lână. Ele adoptă o structură α-helix regulat, într-un procent foarte ridicat.

Numărul mare de legături disulfurice inter- şi intracatenare asigură keratinei proprietăți remarcabile: insolubilitate, elasticitate, rezistență mecanică. O rezistență deosebită manifestă keratina şi față de majoritatea enzimelor proteolitice, cu excepția enzimelor produse de molia de haine, care o atacă hidrolitic.

β-Keratinele nu conțin aminoacizii cu sulf cisteina şi cistina, în schimb conțin într-un procent ridicat aminoacizi cu moleculă mică, cum sunt: glicina, alanina şi serina. Aceste proteine se găsesc în firul de mătase produs de viermele Bombix mori, firele pânzei de păianjen, solzi, ghearele şi ciocul păsărilor etc.

Spre deosebire de α-keratină, care conține structură α-helix într-un procent foarte mare, β-keratina corespunde modelului structural de foaie pliată într-o proporție de aproape 100% (în fibroină).

Prin microscopia electronică s-a constatat că firele de lână şi păr sunt formate din mănunchiuri de macrofibrile. Macrofibrilele sunt formate din fibrile mai subțiri, alcătuite, la rândul lor din mănunchiuri de filamente proteice paralele, orientate de-a lungul axei longitudinale.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

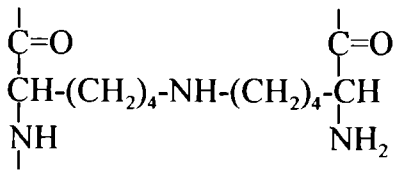
B.Elastina. Este proteina fibrilară, caracteristică din fibrele elastice. Această proteină are proprietăți elastice, fibrele ei putându-se întinde de câteva ori față de lungimea normală.

Elastina este principala componentă a țesuturilor de legătură elastice din plămâni, vasele sanguine mari, aortă (30-50% din greutatea uscată) şi ligamente. Țesuturile de legătură neelastice din tendoane conțin cantități mai mici de elastină.

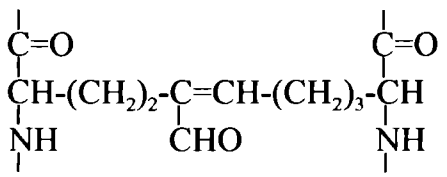
Asemănător fibroinei şi colagenului, elastina are o compoziție distinctivă de aminoacizi. De colagen se diferențiază puțin, prin conținutul său in aminoacizi. Proporția de hidroxiprolină este mică, iar hidroxilisina lipseşte total. Conține însă multă prolină (10% din totalul aminoacizilor), multă glicină (cca. 30%) şi lisină, dar şi mulți aminoacizi nepolari. Una din trei molecule de aminoacizi din secvență este de glicină.

Asemănător colagenului, proteina se biosintetizează în fibroblaşti, sub formă de proelastină şi devine elastină după trecerea în mediul extracelular, unde se uneşte cu colagenul şi alți biocomponenți.

Elastina formează o rețea tridimensională prin legarea covalent încrucişată a fibrelor sale, cu ajutorul unor substanțe cu structuri deosebite, ca desmozina şi izodesmozina, lisinonorleucina şi allisină aldol (care intervine şi în colagen).

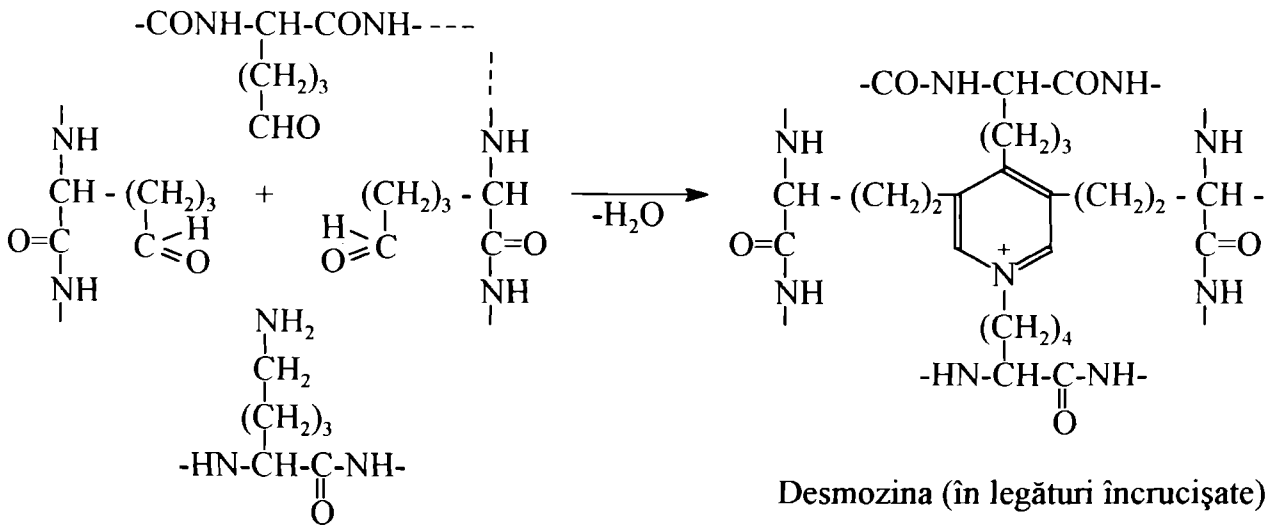


Lisinonorleucina
(în legătură încrucişată)



Allisină aldol
(în legătură încrucişată)

Un exemplu de modul cum se formează legăturile încrucişate care leagă între ele fibrele elastinei este următorul:

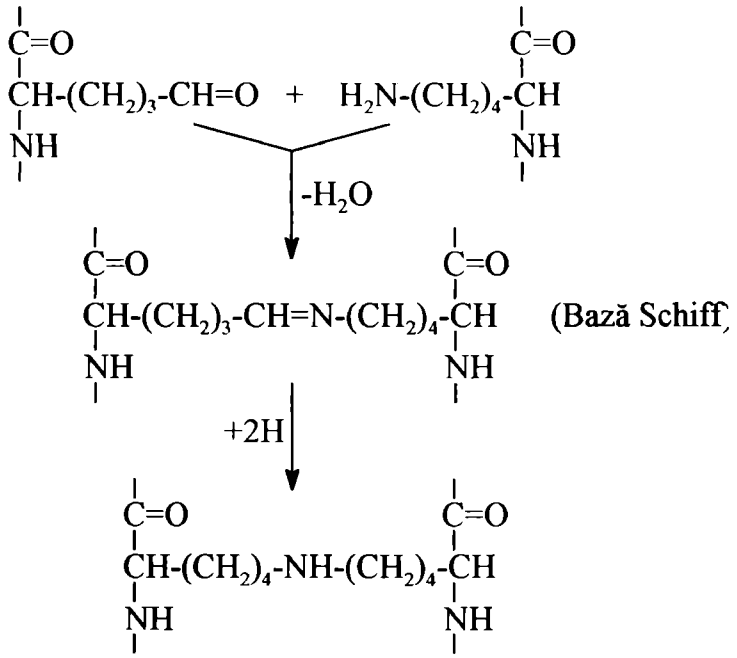


Desmozina (în legături încrucişate)

În această reacție se formează desmozina (şi analog izodesmozina), prin condensarea a trei resturi de allisină şi o catenă laterală a unui rest de lisină. Desmozina şi izodesmozina imprimă elastinei culoarea galbenă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Lisinonorleucina rezultă prin condensarea catenei laterale a unui rest de allisină, cu formarea unei legături aldiminice (bază Schiff), urmată de reducere.



Lisinonorleucină
(în legătură încrucişată)

Legăturile încrucişate dintre catenele polipeptidice ale elastinei conferă acesteia atât insolubilitate cât şi proprietăți elastice.

În țesuturi, elastina se asociază cu glucide şi lipide, însă acumularea de lipide în țesuturile elastice din arterele coronariene şi din aortă reprezintă un factor patogenic al aterosclerozei.

C.Colagenul. O proteină fibrilară cu cea mai mare răspândire în țesuturile animalelor superioare este colagenul. Colagenul deține peste un sfert din totalul proteinelor corpului uman. Se găseşte preponderent în piele, oase, tendoane, cartilaje şi, în cantități mai mici, în multe alte țesuturi.

Biosinteza colagenului se produce în fibrolaşti, desfăşurându-se în 10 etape, schematizate în fig.IV.19:

-asamblarea aminoacizilor;

-hidroxilarea unor resturi de prolină şi lisină;

-glicozilarea;

-evacuarea din celulă;

-transportul la fibrila în creştere;

-transformarea procolagenului în tropocolagen;

-formarea aldehidelor;

-formarea fibrilei;

-stabilirea legăturilor încrucişate.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

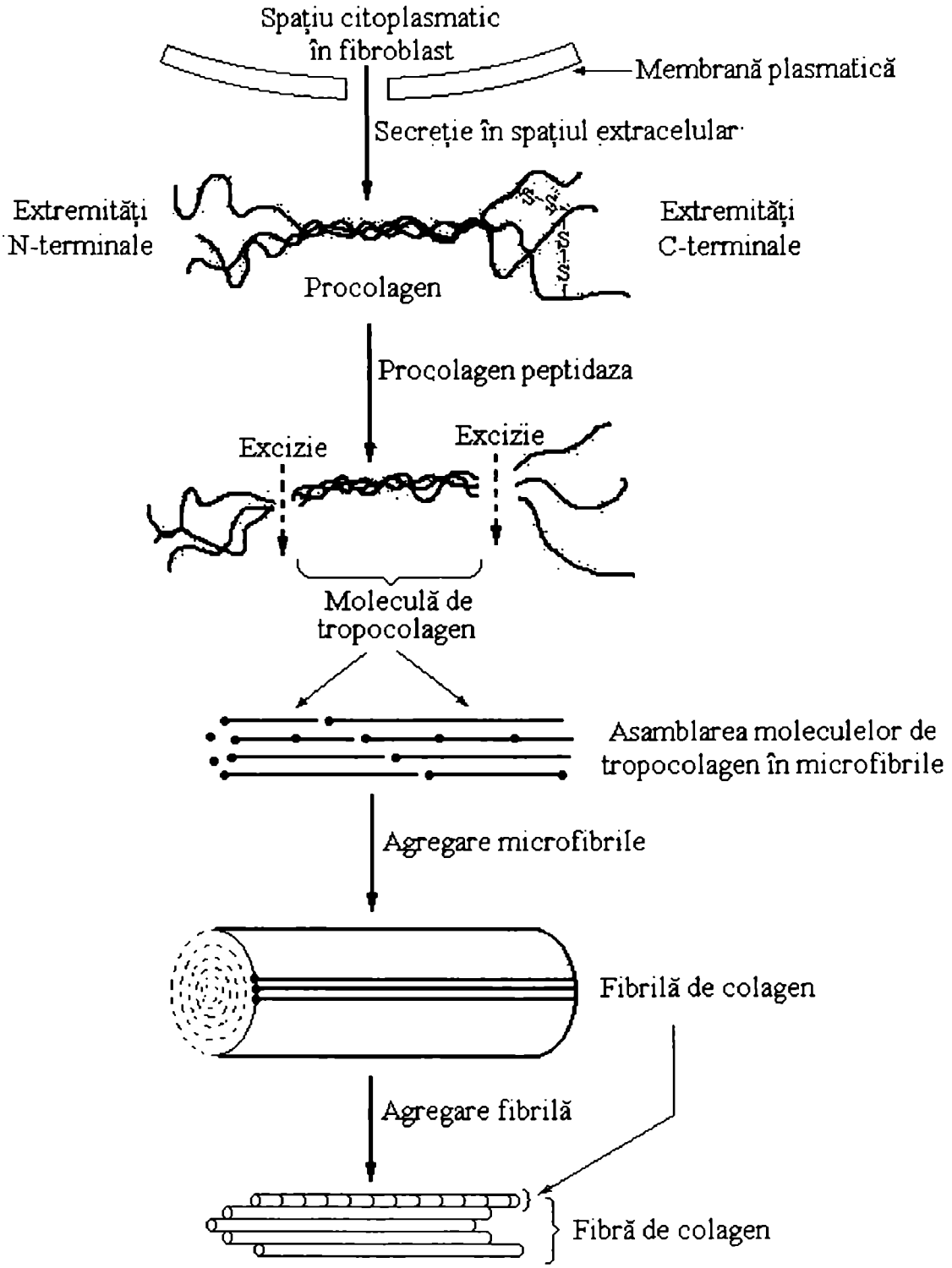


Fig.IV.19 – Principalele etape de formare a fibrelor de colagen

Asamblarea aminoacizilor în secvența lanțului proteic are loc în fibroblaşti, la nivelul ribozomilor, urmând etapele biosintezei proteinelor, conform codului genetic.

Procesul de asamblare se produce rapid, cu circa 200 aminoacizi pe minut, astfel că biosinteza unei catene de 1000-1100 aminoacizi se termină în 5-6 minute.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

După biosinteza catenei proteice din aminoacizi standard, o parte din resturile prolinei şi lisinei din secvenţă suferă reacţii de hidroxilare enzimatică (cu prolilhidroxilază, respectiv lisilhidroxilază).

Pe lângă enzimele necesare, în proces mai intervin şi alţi factori. Spre exemplu, pentru hidroxilarea resturilor de prolină, în afară de prolilhidroxilază mai este necesară prezenţa oxigenului molecular, a ionilor Fe^{2+} şi a vitaminei C.

Înainte de expulzarea din celulă, unele grupe hidroxilice aflate pe lanţurile proteice α se leagă glicozidic de glucoză şi galactoză sau de diglucide derivate din ele (paragraful IV.2.2.3.).

În stadiul intracelular, se formează procolagenul, care, după expulzare din fibrolast, pierde în spaţiul extracelular unele fragmente peptidice neîmpletite (peptide de extensie) de la ambele capete, sub acţiunea proteolitică a procolagen peptidazei. Sunt excizate mai întâi fragmentele neîmpletite de la capătul N-terminal (fiecare având 20 aminoacizi şi masa de 15KDa) şi apoi fragmentele de la capătul C-terminal, fiecare cu masa de 30KDa. Aceste fragmente din urmă sunt unite în structura procolagenului prin legături disulfurice intercatenare.

Moleculele de tropocolagen rezultate se autoasamblează în microfibrile, care se dispun paralel şi se stabilizează prin legături covalente încrucişate. Prin asocierea mai multor microfibrile de colagen (vizibile numai la microscopul electronic), se formează fibrile de colagen (vizibile la microscopul optic). În final, prin asocierea acestor fibrile se formează fibra de colagen (fig.IV.19).

Deşi biosinteza colagenului urmează acelaşi curs în toate ţesuturile, microfibrilele formate se aranjează diferit în diversele organe. Spre exemplu, în tendoane, microfibrilele şi fibrilele sunt aranjate în mănunchiuri paralele, iar în piele, aceste microfibrile colagenice sunt dispuse într-un plan. Problema devine mai complicată în cazul cartilagiilor, unde microfibrilele nu mai pot fi recunoscute, ele aflându-se aici asociate cu proteoglicani.

Diametrul microfibrelor variază de la un organ la altul. Astfel, valoarea acestei dimensiuni în piele este de 60nm, în cartilagii de 15-25nm, în tendoane de 30-120nm şi în cornee de 30nm. Se remarcă faptul că diametrul fibrilelor de colagen creşte cu vârsta, putând ajunge şi până la 200nm.

Prin legăturile încrucişate inter- şi intracatenare, fibrele de colagen capătă o rezistenţă mecanică deosebită. Odată cu vârsta, numărul acestor legături creşte.

Colagenul nativ este rezistent la acţiunea acizilor şi bazelor. La fierbere în apă moleculele de colagen insolubile suferă modificări structurale prin desfacerea legăturilor intercatenare şi prin hidroliza, în parte, a legăturilor peptidice, transformându-se in gelatină (solubilă în apă la cald).

Cu excepţia colagenazei, alte enzime proteolitice nu atacă hidrolitic colagenul, însă, trecut în gelatină, poate fi hidrolizat de enzimele proteolitice.

Ca şi component al pielii, colagenul poate fi supus unor tratamente chimice speciale.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Astfel tratat cu taninuri şi săruri de crom, colagenul se transformă într-un produs greu degradabil chimic şi cu o rezistenţă mecanică mare. Sub acţiunea acestor substanţe, se produc reactii care determina supercontracţia ireversibilă a fibrelor de colagen, proces care stă la baza tehnologiei specifice în tăbăcărie.

Există situaţii când, din cauza unor perturbări metabolice, se produc "boli ale colagenului" sau "colagenoze". În general, aceste boli sunt consecinţele unor deficienţe enzimatice şi se manifestă la nivel cutanat şi osos.

Colagenoliza. Colagenul se reînnoieşte în perioade diferite de timp, în funcţie de organul în care se află.

Prin cercetări cu izotopi marcaţi, s-a găsit că timpul de înjumătăţire a colagenului este: în piele – 200 zile, în muşchi – 60 zile şi în ficat – 30 zile, dar există situaţii când colagenul se degradează şi se reînnoieşte mult mai repede, cum este cazul în involuţia uterului după naştere şi în cursul vindecării rănilor. Dar, oricare ar fi ritmul procesului de reînnoire, în stările fiziologice normale există un echilibru între biosinteză şi degradarea colagenului. Degradarea se produce sub acţiunea colagenazelor şi poartă numele de colagenoliză. Aceste enzime sunt produse de celulele ţesutului conjunctiv, ca zimogen (forma inactivă) numite procolagenaze, care în mediul extracelular sunt activate, trecând în colagenaze efective.

Sub acţiunea colagenazelor asupra colagenului, se formează peptide care conţin hidroxiprolină, alături de hidroxiprolină liberă. Dar hidroxiprolina fiind un aminoacid atipic, nu poate fi utilizat mai departe în biosinteza colagenului (nu-i corespund litere de cod). Din această cauză, hidroxiprolina ajunge în sânge, cu ajutorul căruia o parte merge la ficat şi se degradează, iar altă parte este dirijată spre căile urinare, pentru excreţie.

Prin faptul că, la acţiunea colagenazelor rezultă şi hidroxiprolină, dozarea acestui aminoacid în plasmă şi urină are importanţă în diagnostic, fiind un parametru important pentru stabilirea unor stări patologice însoţite de colagenolize, cum sunt de exemplu, hiperparatiroidismul primar şi anumite boli osoase.

IV.5.3. Holoproteine miofibrilare

Componenta principală a ţesutului muscular o reprezintă proteinele. Rolul proteinelor în muşchiul striat, de exemplu, se manifestă diferenţiat, ele fiind atât sediul unei activităţi enzimatice cât şi elementul principal contractil al fibrei musculare.

Muşchiul striat este alcătuit din formaţiuni musculare alungite, numite fibre musculare, de dimensiuni variabile (lungime 0,1-12cm şi diametru 0,01-0,1mm), aranjate paralel în fascicule.

O fibră musculară este formată din mai multe miofibrile, care constituie, de fapt, elementul contractil al fibrilei musculare.

Prin cercetări de microscopie electronică s-a evidenţiat în structura microfibrilelor prezenţa unor striuri caracteristice, care au fost puse pe seama neomogenităţii lor optice.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Cercetarea la microscopul electronic a unei secțiuni extrem de fine dintr-un țesut muscular striat a pus în evidență prezența unor benzi mai închise, numite benzi A (anizotrope) în alternanță cu benzi mai deschise, numite benzi I (izotrope), respectiv, filamentele groase, cu diametrul de aproximativ 10nm și filamente fine, subțiri, cu diametrul de cca. 5nm.

În mijlocul benzilor A apare o zonă mai luminoasă și mai clară, denumită zona H (discul lui Hansen), iar benzile deschise (I) apar întrerupte de o linie întunecată (Z), numită disc intermediar (Zwischenscheibe). Unitatea morfologică structurală cuprinsă între două linii Z, se numește sarcomer (fig.IV.21a).

Proteinele majore din mușchiul striat sunt cuprinse în tabelul IV.9; dintre acestea, vor fi discutate succint cele mai reprezentative pentru procesul contractil.

Tabelul IV.9 – Proteinele din mușchiul striat

Nr. crt.	Proteina (sau subunitățile)	Masa (KDa)
1	Miozina	540
	-Catenă grea	230
	-Catenă ușoară 1 (LC_1)	~20
	-Catenă ușoară 2 (LC_2)	~20
2	Actina G	42
3	Actina F	--
4	Tropomiozina	33
5	Troponina	72
	-Troponina C (TnC)	18
	-Troponina I (TnI)	23
	-Trponina T (TnT)	31
6	α-Actinina	200
7	β-Actinina	34
8	Vimentina	52
9	Proteina C	150
10	Proteina M	100
11	Desmina	50

IV.5.3.1. Proteine din filamentele groase

Miozina este proteina specifică a filamentelor musculare groase, reprezintă 35% din proteinele musculare și 55-60% din proteinele miofibrilare. Miozina are o structură caracteristică, parțial globulară, parțial fibrilară, care îi atribuie anumite proprietăți asemănătoare atât proteinelor globulare cât și celor fibrilare. Are masa moleculară de 540KDa și o formă disimetrică, alungită, ca în fig.IV.20.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

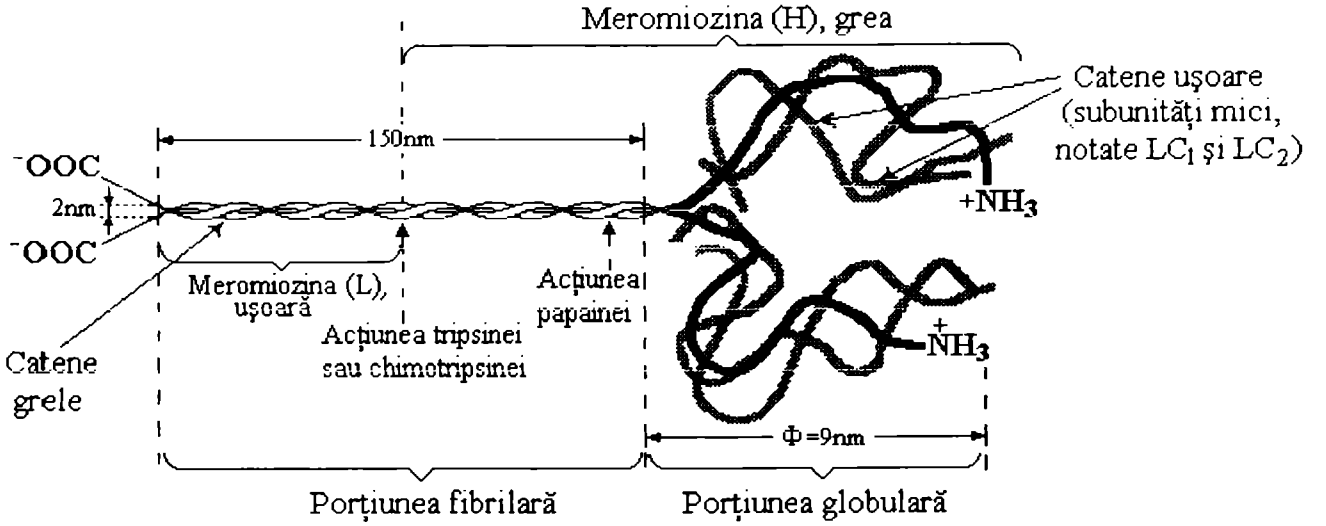


Fig.IV.20 – Molecula disimetrică a miozinei

Molecula miozinei conţine două catene lungi (catene grele), egale ca mărime, fiecare având masa moleculară de 230KDa şi 1800 resturi de aminoacizi în secvenţă. Acestea sunt cele mai lungi lanţuri polipeptidice cunoscute.

Fiecare dintre cele două catene conţine, în porţiunea fibrilară, structură în α-helix regulat, iar la capătul N-terminal, o structură împachetată, globulară. Pe porţiunea fibrilară ambele catene sunt răsucite într-un dublu helix, iar în regiunea globulară se află, fiecare înfăşurată cu alte două catene polipetidice mai mici (catene uşoare). Mioglobina devine astfel o proteină hexameră. În acest aranjament, masa unei catene uşoare (LC_1 sau LC_2) este de aproximativ 20KDa (tabelul IV.9).

Compoziţia în aminoacizi a miozinei se remarcă printr-un conţinut bogat în acizi monoaminodicarboxilici şi diaminomonocarboxilici, care, prin numeroasele lor grupe polare, disociabile, contribuie la accentuarea activităţii biochimice, îndeosebi faţă de ioni.

Pe lângă aminoacizi standard, miozina conţine şi aminoacizi atipici, ca 3-metilhistidina, ε-N-metillisina şi ε-N-trimetillisina.

Printr-o hidroliză blândă, controlată, cu tripsină sau chimotripsină, miozina se scindează în două fragmente numite meromiozine: meromiozina L (meromiozina uşoară), având masa moleculară de 12KDa, lungimea de 90nm, diametru de 2nm şi meromiozina H (meromiozina grea), cu masa moleculară de 320KDa, lungimea de 80nm şi diametru de 3nm.

În mod asemănător, sub acţiunea enzimatică a papainei, miozina se scindează în două fragmente: unul provenit din capătul globular şi unul conţinând restul moleculei, porţiunea fibrilară.

Prin regiunea globulară, miozina se leagă reversibil de o altă proteină miofibrilară, actina, formând un complex numit actomiozină, care joacă rol important în procesul contractil (fig.IV.21).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tot în partea globulară miozina conține și o microregiune specifică, numită centru activ, care-i conferă proprietăți de ATP-ază.

$$ATP + H_2O \xrightarrow{\text{Miozină}} ADP + H_3PO_4 + \text{Energie}$$

Enegia degajată din această reacție este transferată moleculei de miozină, care o utilizează mai departe în procesul contractil.

IV.5.3.2. Proteine din filamente subțiri

Filamentele musculare subțiri conțin actină, tropomiozină și troponină.

Actina este proteina principală din filamentele musculare subțiri în eucariote și este localizată în benzile clare (I) ale sarcomerului (fig.IV.21). Deține 14% din proteinele musculare și 20% din masa miofibrilei. La tărie ionică mică se găsește ca G-actină monomer globular, bilobal, cu masa moleculară de 42KDa, iar în condiții fiziologice, aceasta polimerizează la F-actină (fibrilară). În cadrul actinei F, subunitățile actinei G sunt dispuse în dublu helix.

Actina F se poate combine cu miozina, formând actomiozina, un produs cu vâscozitate mare. Un lanț de F-actină, format din mai mulți monomei de G-actină, are posibilitatea să lege mai multe molecule de miozină. Aceste legături se realizează între partea activă și capetele globulare ale miozinei, formând actomiozina. Actomiozina se disociază în prezența ATP, având loc și contracția complexului.

Proteinele menționate mai sus constituie substratul molecular al contracției musculare, fiind deci proteine contractile. Alte proteine asociate filamentelor subțiri sunt ultimele două menționate, tropomiozina și complexul troponinic, care sunt, de fapt, proteine reglatoare.

-Tropomiozina este o proteină fibrilară, bicatenară, ale cărei subunități sunt înfășurate una în jurul celeilalte, formând un dublu α-helix. Are lungimea de 40nm, masa moleculară de 70KDa și se poate combina cu actina. Din totalul proteinelor musculare, tropomiozina deține aproximativ 2,5%.

-Troponina este o proteină cu masa moleculară de 80KDa și deține 3-5% din greutatea miofibrilei. Se prezintă ca un complex proteic, format din trei subunități:

a)TnC, o subunitate proteică, care leagă ionii de calciu;

b)TnI, o subunitate proteică, care se leagă la actină;

c)TnT, o moleculă alungită, care se leagă de tropomiozină prin capătul ei de legătură.

Contracția musculară. Activitatea musculară – contracția și relaxarea – se poate produce prin glisarea filamentelor groase, de-a lungul filamentelor subțiri, mai exact, glisarea miozinei de-a lungul grupului format din triada actină-tropomiozină-troponină (fig.IV.21).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

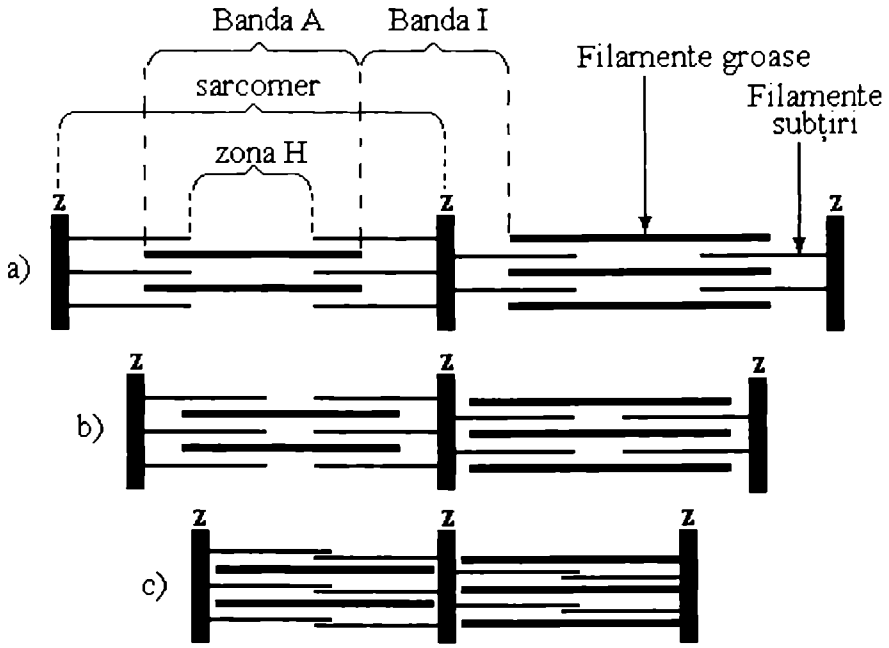


Fig.IV.21 – Reprezentarea schematică a filamentelor glisante în timpul contracției: a)Relaxat; b)Contractat; c)Contractat la maxim

În acest proces, intervine o modificare morfologică a miofibrilelor. Prin cercetări de microscopie electronică, s-a putut evidenția dispunerea filamentelor groase şi subțiri cât şi prezența unor benzi şi zone specifice.

Din fig.IV.21 se observă că, în timpul trecerii de la starea de relaxare (a) sau de contracție (b, c), banda A rămâne constantă, iar benzile I şi zona H se modifică.

În mușchii striați şi mușchiul cardiac, contracția este declanşată prin excitație nervoasă, care determină eliberarea ionului de calciu din reticulul sarcoplasmatic.Aceasta are loc sub acțiunea ATP-azei Ca-Mg dependentă, iar ionul de calciu eliberat se fixează pe troponină, producând modificări în conformația tropomiozinei şi actinei.

Formațiunea actină-tropomiozină-troponină activată intercaționează cu partea globulară din miozină, favorizând crearea unei legături pentru fixarea ATP la această din urmă proteină. În continuare, ATP fixat este hidrolizat sub acțiunea ATP-azei miozinice.

Prin legarea triadei actină-tropomiozină-troponină la miozină se produc modificări asupra părții ei globulare, care au drept consecință glisarea miozinei pe o distanță de 7,5nm. La repetarea acestei glisări se produc modificări ale miofibrilelor.

Contracția mușchiului neted şi a celulelor nemusculare se produce după un mecanism diferit, implicând şi alți factori, precum calmodulina, protein-kinaza, miozina activă etc.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

IV.6. Proteine conjugate (heteroproteine sau proteide)

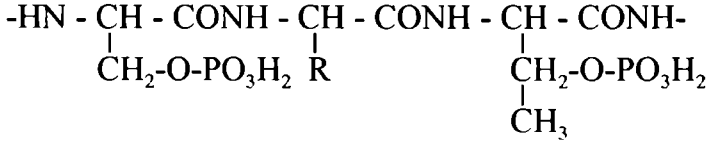
Proteinele conjugate sunt formate dintr-o componentă proteică şi una prostetică (neproteică).

Componenta prostetică (numită şi grupă prostetică sau parte prostetică) poate fi de natură foarte diferită şi, în funcţie de constituţia ei, se leagă de componenta proteică prin legături covalente, ionice sau polare. În anumite condiţii aceste legături se rup, dezmembrând heteroproteina în cele două părţi componente.

Partea prostetică este elementul structural caracteristic care stă la baza clasificării heteroproteinelor în mai multe grupe şi anume: fosfoproteine, glicoproteine, lipoproteine, cromoproteine, metaloproteine şi nucleoproteine.

IV.6.1. Fosfoproteine

Partea prostetică este reprezentată de resturi de acid ortofosforic (H_3PO_4). Aceasta se ataşează la partea proteică prin legătură fosfoesterică, care ia naştere în urma esterificării grupei –OH alcoolică din serină (în principal) sau treonină, cu acid ortofosforic.



Resturile acidului ortofosforic din grupele fosfoesterice imprimă proteinei un caracter acid, deci proprietatea de a reacţiona cu cationii metalici, formând săruri. Grupele fosfoesterice apar de regulă în organism, salifiate cu ioni de calciu sau potasiu.

Fosfoproteinele se găsesc în organismele animale, produse animale (ouă, lapte etc.), în bacterii şi drojdii. Sunt insolubile în apă şi acizi. Se dizolvă în soluţii alcaline, de preferinţă în soluţii de bicarbonaţi alcalini, formând săruri solubile. Dintre reprezentanţii mai importanţi ai acestei grupe se menţionează caseina din lapte şi vitelina, vitelenina, fosfovitina din gălbenuşul de ou.

IV.6.1.1. Fosfoproteine din lapte

Caseina. Principala proteină din lapte, caseina, este un amestec eterogen de fosfoproteine, format din α, β şi γ-caseine, care diferă între ele prin conţinutul în fosfor, aminoacizi, mobilitate electroforetică şi proporţia în care se găsesc, respectiv 75:20:5.

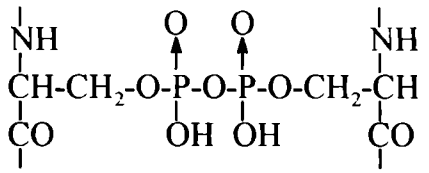
Caseinele se află în lapte sub formă de caseinat de calciu solubil. La încălzire nu coagulează, dimpotrivă, împiedică coagularea albuminelor şi globulinelor din lapte în timpul fierberii.

Precipitarea caseinei se produce prin acidularea laptelui până la punctul izoelectric (pH_i=4,6). Acest efect se produce şi în cadrul fermentaţiei lactice, unde se formează acid lactic, care, în mod natural, acidulează mediul, determinând precipitarea caseinei.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Dar precipitarea caseinelor se produce şi prin acţiunea unor enzime, precum chimozina (din stomacul animalelor tinere) şi pepsina. Procesul precipitării caseinelor are loc în prezenţa ionilor de calciu, când se formează paracaseinatul de calciu, insolubil, reprezentând componenta principală a brânzei.

Molecula de caseină conţine mai multe catene polipeptidice legate între ele fie prin intermediul grupelor ε-amino din lisină, fie prin legături fosfodiesterice între catene învecinate.



Caseinele au în structură toţi aminoacizii esenţiali. De aceea, atât prin conţinutul în caseină cât şi în alte categorii de substanţe (lipide, glucide etc.), laptele este considerat ca un aliment cu valoare nutritivă completă.

IV.6.1.2. Fosfoproteine din ou

Fosfoproteinele din gălbenuşul de ou sunt: fosfovitina (9,7%P), vitelina (1%P), vitelenina (0,28%P) şi livetina (0,05%P).

Dintre acestea, vitelina şi vitelenina formează cenapse cu fosfatidele (de exemplu, cu lecitinele) sub formă de lipovitelină (1,5%P) şi lipovitelenină (1,7%P) – practic, fosfolipoproteine.

Predominantă între fosfoproteinele gălbenuşului de ou este fosfovitina, care conţine o cantitate însemnată de serină (cca 33% din totalul aminoacizilor), fiind fosforilată în totalitate sub forma legăturilor monoesterice.

Prin electroforeză se separă din proteinele glălbenuşului de ou, fracţiunile α_1-, β_1-, β_2- şi γ-fosfopeptidice, numite ovotirine. În particular, fracţiunea β_2-ovotirină se numeşte şi acid vitelinic. Aceste proteine sunt bogate în fosfor. Ele sunt sintetizate în ficatul păsărilor şi reprezintă sursa de aminoacizi şi resturi fosfat, necesare dezvoltării embrionului.

Şi albuşul de ou conţine o fracţiune ovalbuminică de natură fosfoproteică, separabilă în două subfracţiuni: A_1-ovalbumina fosfatată, cu doi atomi de fosfor pe moleculă şi A_2-ovalbumina fosfatată, cu un atom de fosfor pe moleculă.

IV.6.2. <u>Glicoproteine</u>

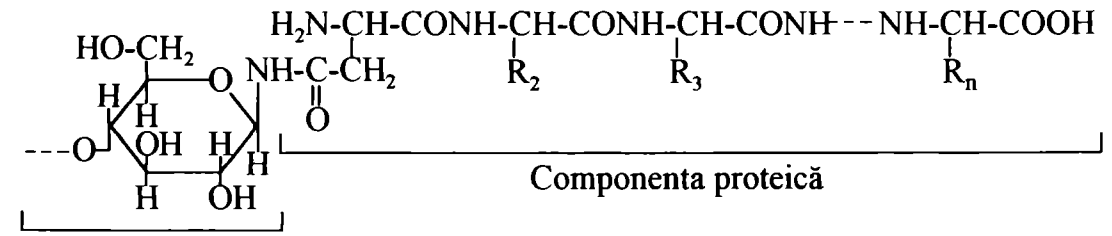
Proteinele conjugate a căror grupă prostetică este o substanţă de natură glucidică, se numesc glicoproteine. Componenta glucidică din glicoproteine deţine între 1 şi 80% din masa moleculară şi este formată, în principal, din fragmente oligozaharidice liniare sau ramificate, de dimensiuni variabile, precum şi din <4% poliglucide (glicoproteine propriu-zise) şi >4% poliglucide (mucoproteine).

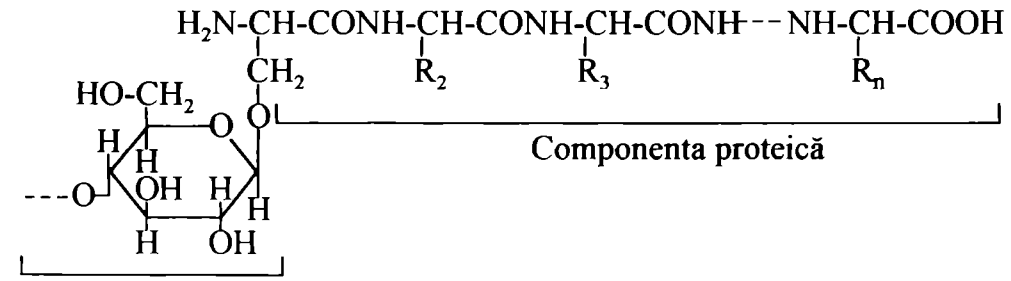
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Monoglucidele care structurează componenta glucidică în aceşti compuşi sunt: manoza, glactoza, fucoza, arabinoza, xiloza, glucozamina şi acidul sialic.

Legăturile dintre componenta proteică şi cea glucidică sunt covalente, de tip N- şi O-glicozidic. Acestea se formează prin participarea unei grupe $-NH_2$ dintr-un rest de aminoacid (chiar şi din grupa amidică a asparaginei) sau a grupelor –OH din resturile serinei, treoninei, hidroxilisinei şi hidroxiprolinei, aparţinând părţii proteice şi grupa –OH glicozidică a unui rest glucidic din partea prostetică (ca glucoză şi galactoză).

Exemplu:





La formarea legăturilor N- şi O-glicozidice iau parte preponderent N-acetilglucozamina şi N-acetilgalactozamina, la celălalt capăt al lanţului oligoglucidic aflându-se adesea acidul sialic.

După compoziţia în glucide, oligoglucidele N-glicozidice se împart în două categorii:

a)simple, care conţin N-acetil-glucozamină şi multe resturi de manoză;

b)complexe, care conţin N-acetil-glucozamină, manoză, galactoză N-acetilgalactozamină şi acid sialic.

Spre deosebire de mucopoliglucide (glicozaminoglicani) în care componenta glucidică este majoră, în glicoproteine este predominantă componenta proteică.

Biosinteza glicoproteinelor începe în reticulul endoplasmatic prin formarea unui precursor oligoglucidic şi transferul acestuia pe proteina acceptoare în curs de sinteză; se termină în aparatul Golgi, prin prelucrarea oligoglucidului precursor din molecula glicoproteinelor. Glicanul este modificat aici, prin eliminare sau adiţie de glucide sau derivaţi glucidici. În final se formează glicoproteinele mature, având un fragment oligoglucidic specific.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Distribuţie şi rol biologic. Glicoproteinele au o mare răspândire în natură, găsindu-se în organismele animale, vegetale şi în microorganisme – drojdii, bacterii şi virusuri. Aceşti bioconstituenţi au fost izolaţi din celule, dar şi din spaţiul extracelular.

În organismul omului şi animalelor, glicoproteinele îndeplinesc funcţii (şi roluri) diverse:

-biocomponenţi tisulari în ţesutul muscular, ţesutul conjunctiv şi ţesutul sanguin;

-transportori ai multor substanţe biologic active, ca: enzime, hormoni, anticorpi, medicamente, nutrienţi etc.;

-în organismele animale joacă un rol deosebit în procesele de apărare, creştere celulară, medierea unor varietăţi de interacţiuni intercelulare etc.

Activitatea biologică a glicoproteinelor este efectuată, în general, de partea proteică a glicoproteinelor. Partea glucidică răspunde de aspectul informaţional care-i permite atât modularea funcţiei acestor entităţi cât şi decizia asupra destinaţiei şi duratei lor de existenţă.

Glicoproteinele îndeplinesc rol de protecţie a mucoaselor aparatului digestiv, aparatelor respirator şi urogenital, împotriva agenţilor mecanici, chimici şi a enzimelor proteolitice; sunt componente de grup sanguin, împiedică aglutinarea hematiilor etc.

Exemple de glicoproteine sunt colagenul şi elastina, având rol structural în alcătuirea matrixului celular.

Structură glicoproteică au şi o serie de hormoni, ca: hormonul foliculostimulator, hormonul luteinizant şi hormonul tireotrop. Multe glicoproteine intră în structura membranelor biologice, dintre care mai cunoscute sunt glicoforinele şi glicoproteina din banda III (electroforetică).

În categoria glicoproteinelor se încadrează şi unele proteine de apărare şi de recunoaştere, cum sunt imunoglobulinele, factorii sistemului complement, interferonul, receptorii hormonali, trombina şi fibrinogenul dintre proteinele coagulării sângelui etc. Şi unele proteine de transport a unor compuşi endo- sau exogeni ca feritina, ceruloplasmina, factorul intrinsec, haptoglobina, proteinele de transport a unor hormoni etc., fac parte din categoria glicoproteinelor.

IV.6.3. Lipoproteine

Lipoproteinele sunt proteine conjugate, a căror parte prostetică este un compus de natură lipidică. Componenta lipidică din lipoproteine poate fi reprezentată de: trigliceride, fosfolipide, colesterol liber sau esterificat şi acizi graşi.

Partea proteică, numită în acest caz şi apolipoproteină, are o masă moleculară în jur de 100KDa şi este formată din mai multe subunităţi identice.

Asocierea dintre partea proteică şi cea prostetică se face, în lipoproteine, prin legături ionice şi, mai ales, prin interacţii hidrofobe, determinate de tendinţa componentelor nepolare de a se asocia în mediu apos. Componenta proteică din lipoproteine conţine cantităţi însemnate de aminoacizi nepolari, care-şi aduc o bună contribuţie în acest sens. La asocierea celor două componente din lipoproteine este posibilă şi participarea forţelor van der Waals.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabelul IV.10 – Tipuri mai importante de lipoproteine şi compoziţia lor

Proveniență	Lipoproteine (fracțiuni)	Lipide majore	Mase moleculare (KDa)	Densitate (g/cm^3)	Diametrul particulei (nm)	Proteine %	Lipide %				
							Total	Triacil-gliceroli	Fosfolipide	Colesterol	Acizi graşi liberi
Plasmă sanguină	Chilomicroni	Triacilgliceroli din dietă	$0,4\text{-}30x10^6$	<0,95	80-500	1-2	96-99	86-94	3-8	0,5-1	
	Lipoproteine cu densitate foarte mică (VLDL, pre-β-lipoproteine)	Triacilgliceroli endogeni, esteri ai colesterolului, colesterol	$5\text{-}10x10^3$	0,96-1,006	25-75	5-10	89-94	55-65	12-18	6-8	
	Lipoproteine cu densitate intermediară (IDL)	Esteri ai colesterolului, colesterol, triacilgliceroli		1,06-1,019	25-35						
	Lipoproteine cu densitate mică (LDL, β-lipoproteine)	Esteri ai colesterolului, colesterol, triacilgliceroli	$2,2\text{-}3,5x10^3$	1,019-1,063	18-28	20-24	75-80	8-12	20-25	5-10	
	Lipoproteine cu densitate mare (HDL, α-lipoproteine)	Esteri ai colesterolului, colesterol	$0,25x10^3$	1,063-1,210	5-12	45-50	50-55	3-6	20-30	3-5	
	Acizi graşi liberi (AGL)	Acizi graşi		1,28		99	1				1
Gălbenuş de ou	β-Lipovitelina					78		9	12	1	
Lapte	Cu densitate mică					13		35	52	0	

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Legătura ionică se stabileşte între grupele anionice şi cationice, aparţinând celor două componente ale complexului mixt, lipoproteic. De exemplu, între grupele $-COO^-$ şi $-\overset{+}{N}H_3$ din partea proteică, cu corespondentele lor de semn contrar, $-\overset{+}{N}(CH_3)_3$ şi $-O-PO_3H^-$, din partea prostetică.

Proprietăţile fizice şi chimice distinctive fiecărei părţi componente lipoproteice luată separat, se află combinate în cadrul complexului lipoproteic.

Lipoproteinele au o mare răspândire în materia vie, găsindu-se în celule, membranele biologice, mitocondrii, sânge (în plasmă şi ser), limfă (la organismele animale şi om), în gălbenuşul de ou şi lapte (în produse animale), în cloroplaste (la plante). Câteva exemple sunt prezentate în tabelul IV.10, însoţite de unele caracteristici mai importante.

Lipoproteinele sunt complecşi moleculari hibrizi, cu molecule mari şi mase moleculare variind în limite foarte largi. Potrivit compoziţiei lor, între diferitele lipoproteine intervin diferenţe în proprietăţi (densitate, dimensiunea particulelor, sarcină electrică, absorbţii caracteristice etc.).

Componenta proteică, hidrofilă, ca şi cea prostetică, hidrofobă, atribuie lipoproteinelor un rol important în permeabilitatea selectivă a membranelor biologice. Lipoproteinele plasmatice îndeplinesc rolul vital în solubilizarea şi transportul lipidelor şi a altor substanţe insolubile în apă, ca unele vitamine, anumiţi hormoni, carotenoide, colesterol, medicamente etc., prin plasma sanguină şi alte fluide apoase ale organismului. În acelaşi timp, ele contribuie la păstrarea compoziţiei lipidice a membranelor şi la reglarea proceselor metabolice în celulă.

Separarea lipoproteinelor se poate face foarte bine prin ultracentrifugare sau prin electroforeză. Astfel, prin ultracentrifugare, proteinele plasmatice au fost separate în patru fracţiuni majore, care au fost nominalizate în acord cu caracteristicile lor fizico-chimice mai importante (masa moleculară, constanta de sedimentare, densitatea şi mobilitatea electroforetică), după cum urmează:

-chilomicroni (CM);

-lipoproteine cu densitate foarte mică (VLDL=Very-Low-Density-Lipoproteins);

-lipoproteine cu densitate mică (LDL=Low-Density-Lipoproteins);

-lipoproteine cu densitate mare (HDL=High-Density-Lipoproteins).

Supuse unui câmp gravitaţional puternic, de aproximativ 100.000xg, lipoproteinele, în funcţie de densitatea mediului de dispersie, vor sedimenta sau vor flota (se ridică la suprafaţă). Ele sedimentează când au densitatea mai mare decât a mediului de dispersie şi flotează când au densitatea mai mică decât a acestuia. În fenomenul de flotaţie intervine o constantă caracteristică în grupa lipoproteinelor, numită constanta de flotaţie.

Efectuând electroforeza în geluri de agaroză sau poliacrilamidă asupra lipoproteinelor din aceste fracţiuni, la pH alcalin (8,6) şi utilizând coloranţi specifici pentru vizualizare, s-au putut face unele observaţii şi atribuiri:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

-CM nu migrează în câmpul electric;

-VLDL migrează în imediata vecinătate a α_2-globulinelor şi se consideră pre-β-lipoproteine;

-LDL migrează alături de β-globuline şi se consideră a fi β-lipoproteine;

-HDL migrează alături de α_1-globuline şi se apreciază a fi α-lipoproteine.

Aceste atribuiri se observă mai bine pe electroforegrama din fig.IV.22.

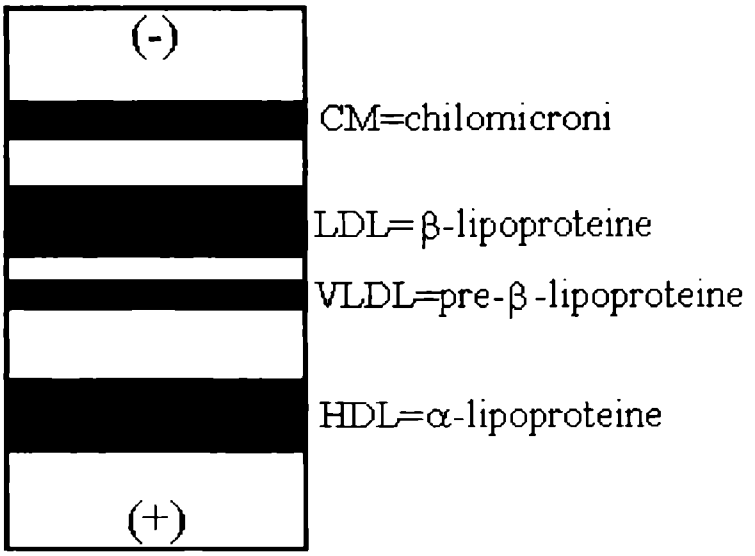


Fig.IV.22 – Fracţiunile lipoproteice pe electroforegrama unui ser uman

Lipoproteinele din plasma sanguină şi ser sunt asociate frecvent α- şi β-globulinelor, fracţiuni pe care le însoţesc în timpul migrării electroforetice.

Cercetările ulterioare au mai evidenţiat o nouă grupă de lipoproteine, cu densitate intermediară (IDL=Intermediate-Density-Lipoproteins) (tabelul IV.10).

În organismul uman şi animal, lipoproteinele îndeplinesc, în general, diferite roluri: constituenţi celulari, intervin în permeabilitatea membranelor biologice, în transportul unor substanţe liposolubile prin lichidele biologice, furnizează energie.

Lipoproteinele din ou participă la transportul de lipide necesare dezvoltării embrionului.

IV.6.4. Metaloproteine

Metaloproteinele sunt proteine conjugate, a căror parte prostetică este reprezentată de un metal. Metalele (M) din partea prostetică participă, de fapt, sub formă ionică (M^{n+}).

Aceste metale întâlnite în condiţii normale în structura metaloproteinelor se numesc şi biometale, dintre care se evidenţiază câteva exemple: Fe, Cu, Mg, Zn, Mn, Co, Cr, V.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

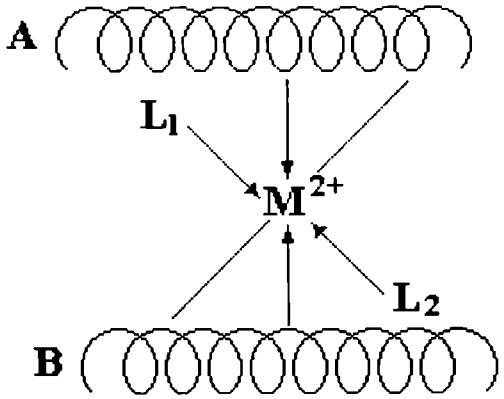


Fig.IV.23 – Structura unui chelat metaloproteic

A, B= catene proteice;

L_1, L_2= molecule mici, ca liganzi

În aceste proteine, asocierea între partea proteică şi cea prostetică se realizează, în primul rând, prin legături covalent-coordinative, care implică grupele donoare de electroni din apoproteină, numite liganzi şi ionul metalic partener.

Prin legăturile covalente-coordinative care intervin, metalul devine coordinat. Astfel fixat la componenta proteică, metalul are capacitatea de a stabili legături ale proteinei şi cu alte molecule mici, funcționând ca liganzi (de exemplu, L_1 şi L_2, din fig. IV.23), formând un complex intern, numit chelat.

Grupele chimice donoare de electroni din componenta apoproteinei, care funcționează ca liganzi, trebuie să aibă o anumită dispunere spațială în structura proteică, pentru a putea permite formarea acestor legături cu ionul metalic.

În metaloproteine, metalul este legat complex (chelat) de resturi de aminoacizi din apoproteină, spre deosebire de unele cromoproteine în care metalul este cuprins în grupele prostetice (hemoglobina, mioglobina, cloroplastina etc.).

La formarea legăturilor covalent-coordinative între liganzi şi ionul metalic, liganzii participă prin atomii N sau O (din aminoacizi) ca părți donoare de electroni.

De la caz la caz, metaloproteinele conțin unul sau mai mulți ioni metalici, fiecare dintre ei având un anumit rol.

Clasificarea metaloproteinelor se poate face după anumite criterii:

a)funcționale, în care se disting: metaloproteine cu rol de bioconstituenți şi metaloproteine cu rol de efectori biochimici;

b)structurale, având ca reper natura metalelor din structura lor. Din acest punct de vedere, se întâlnesc metaloproteine cu: fier, cupru, zinc sau cu mai multe specii de metale.

Metaloproteinele au funcții biochimice variate. Unele dintre ele îndeplinesc funcția de transport pentru metale în organism. Spre exemplu, transferina şi siderofilina din plasmă, pentru transportul de fier, iar ceruloplasmina, pentru cupru.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Alte metaloproteine îndeplinesc funcția de stocare (depozit) pentru unele metale. Un exemplu îl constituie feritina, implicată în stocarea fierului în organism (vezi și tabelul IV.11).

Tabelul IV.11 – Metaloproteine care conțin fier (fieroproteine)

Fieroproteine	Conținutul de fier %	Sediul	Funcția biologică îndeplinită
Hemoglobina	0,34	Celule roșii	Transportor de O_2
Feritina	23	Ficat	Depozit de fier al organismului
Siderofilina	0,12	Splină și plasmă	Transportor de fier
Transferina*)	--	Plasmă	Transportor de fier
Ovotransferina	--	Albuș de ou	Transportor de fier
Lactotransferina		Lapte	Transportor de fier
Mioglobina	0,34	Mușchi	Trasportor și rezervor de O_2 în mușchi

*) Conține și cupru sau zinc.

Un număr însemnat de metaloproteine au proprietăți catalitice, făcând parte din clasa enzimelor. În enzime, metalul servește ca punte între componenta proteică și substrat sau, cu mare probabilitate, acesta îndeplinește nemijlocit funcția catalitică.

IV.6.5. Cromoproteine

Cromoproteinele sunt heteroproteine care au drept componentă prostetică o substanță colorată. De cele mai multe ori, grupa prostetică conține în structură un ion metalic, spre deosebire de metaloproteine, în care atomii metalici înșiși joacă rol de grupă prostetică.

În această categorie se încadrează, în primul rând, proteinele a căror grupă prostetică este de natură porfirinică. Metalele care se încorporează în macrociclul porfirinic pentru a structura grupa prostetică pot fi: Fe, Mg, Cu, Co, Zn etc.

Deosebirile care apar între diversele cromoproteine sunt generate de natura componentei proteice, natura radicalilor legați la nucleul porfirinic și atomului de metal din grupa prostetică.

Sunt și situații când unele cromoproteine, datorită structurii complexe la care participă componente prostetice diferite (substanțe cromogene și metale), pot fi considerate atât în categoria cromoproteinelor cât și în cea a metaloproteinelor. Dintre acestea fac parte: hemoglobina, mioglobina, citocromii, hemocianina, clorofilele etc.

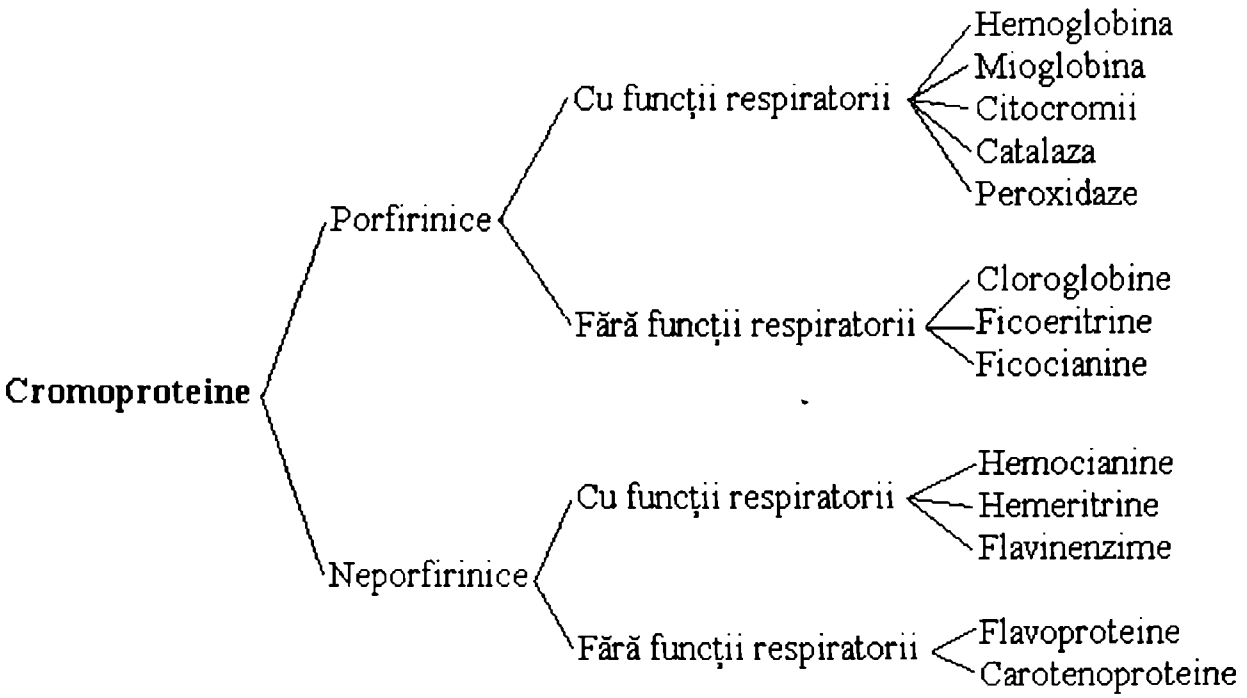
Denumirea de "cromoproteine" provine de la cuvântul din limba greacă "chroma", care înseamnă culoare.

Cromoproteinele au o largă răspândire în natură, găsindu-se în organismele animale și vegetale. Rolul lor biologic este deosebit de important și divers.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

IV.6.5.1. Clasificarea cromoproteinelor

După natura grupei prostetice şi funcţia biologică îndeplinită, cromoproteinele se clasifică astfel:



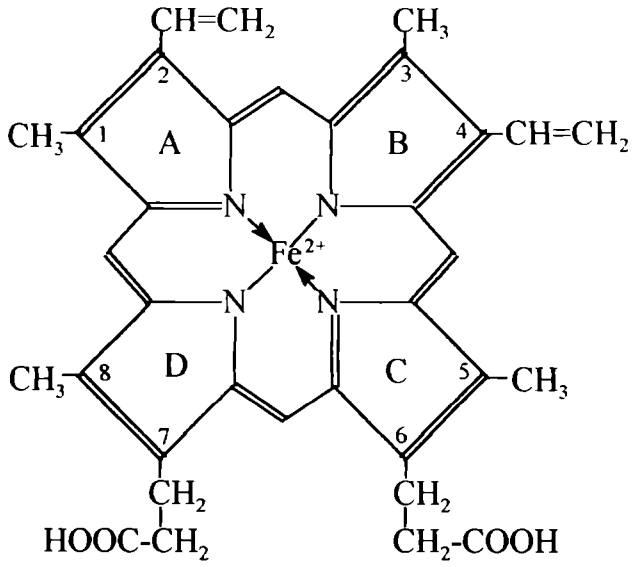
Fiecare dintre aceste substanţe îşi are rolul şi importanţa ei biologică. În continuare, vor fi trataţi, selectiv, termenii cei mai reprezentativi din clasa cromoproteinelor.

IV.6.5.1.1. Cromoproteine porfirinice cu funcţie respiratorie

Proteinele din această grupă au ca parte prostetică un compus porfirinic – hemul sau derivaţi ai hemului.

Hemul este format din protoporfirină (1,3,5,8-tetrametil-2,4-divinil-6,7-dipropionil porfina) şi ionul Fe^{2+}, plasat în poziţie centrală, legat prin două legături covalente şi două coordinative, la cei patru atomi de azot din nucleele pirolice ABCD. Molecula hemului este plană, are 11 legături duble conjugate continuu şi are caracter aromatic. Deci ionul Fe^{2+} şi toţi cei 8 substituenţi din moleculă sunt cuprinşi într-un singur plan (planul macrociclului).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Hem

Compuşii mai reprezentativi din grupa fieroporfirinelor sunt: hemoglobina, mioglobina, citocromii, catalazele şi peroxidazele. Ei participă la transportul oxigenului în organismul animal şi, direct sau indirect, la procesele biochimice specifice ale respiraţiei (de exemplu, oxidări celulare).

Hemoglobina. Hemoglobina (Hb) face parte din categoria proteinelor fieroporfirinice. Are ca parte proteică – globina şi prostetică – hemul. Reprezintă în jur de 90% din proteina totală a eritrocitelor, unde este concentrată în citoplasmă.

Globina este o proteină tetrameră (din grupa histonelor), alcătuită din două subunităţi. Fiecare subunitate conţine doi protomeri (unu α şi unu β), care la rândul lor se leagă de câte o moleculă de hem (fig.IV.24). Ansamblul tetramer este astfel constituit din doi protomeri α identici, doi protomeri β identici şi patru molecule de hem, într-un aranjament cuaternar.

Fiecare protomer α este format din 141 resturi de aminoacizi, iar cel β din 146 astfel de resturi. În consecinţă, la formarea edificiului tetramer, cuaternar al globinei din hemoglobină, au participat 574 aminoacizi.

În structura hemoglobinei, ionul Fe^{2+} se află hexacoordinat. În afara celor patru legături coplanare centrale existente în molecula hemului, acesta mai formează încă două legături coordinative, perpendiculare pe planul sistemului heterociclic, în care sunt implicate două resturi de histidină din secvenţa protomerului.

La protomerii de tip α, în poziţiile 58 şi 87, există două resturi de histidină (His-58 şi His-87), care reprezintă locurile de legare a hemului la respectivele catene polipeptidice. Cele două legături care se stabilesc nu se fac în acelaşi mod. Restul His-87 se leagă direct la hem printr-o legătură coordinativă formată între un atom de N al nucleului imidazolic şi ionul Fe^{2+}, situată deasupra şi perpendiculară pe planul macrociclului. Restul His-58 se leagă tot de ionul Fe^{2+}, coordinativ, dedesubtul planului, prin intermediul unei molecule de apă (fig.IV.24).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Fierul devine hexacoordinat, cele 6 legături coordinative fiind îndreptate către vârfurile unui octaedru regulat.

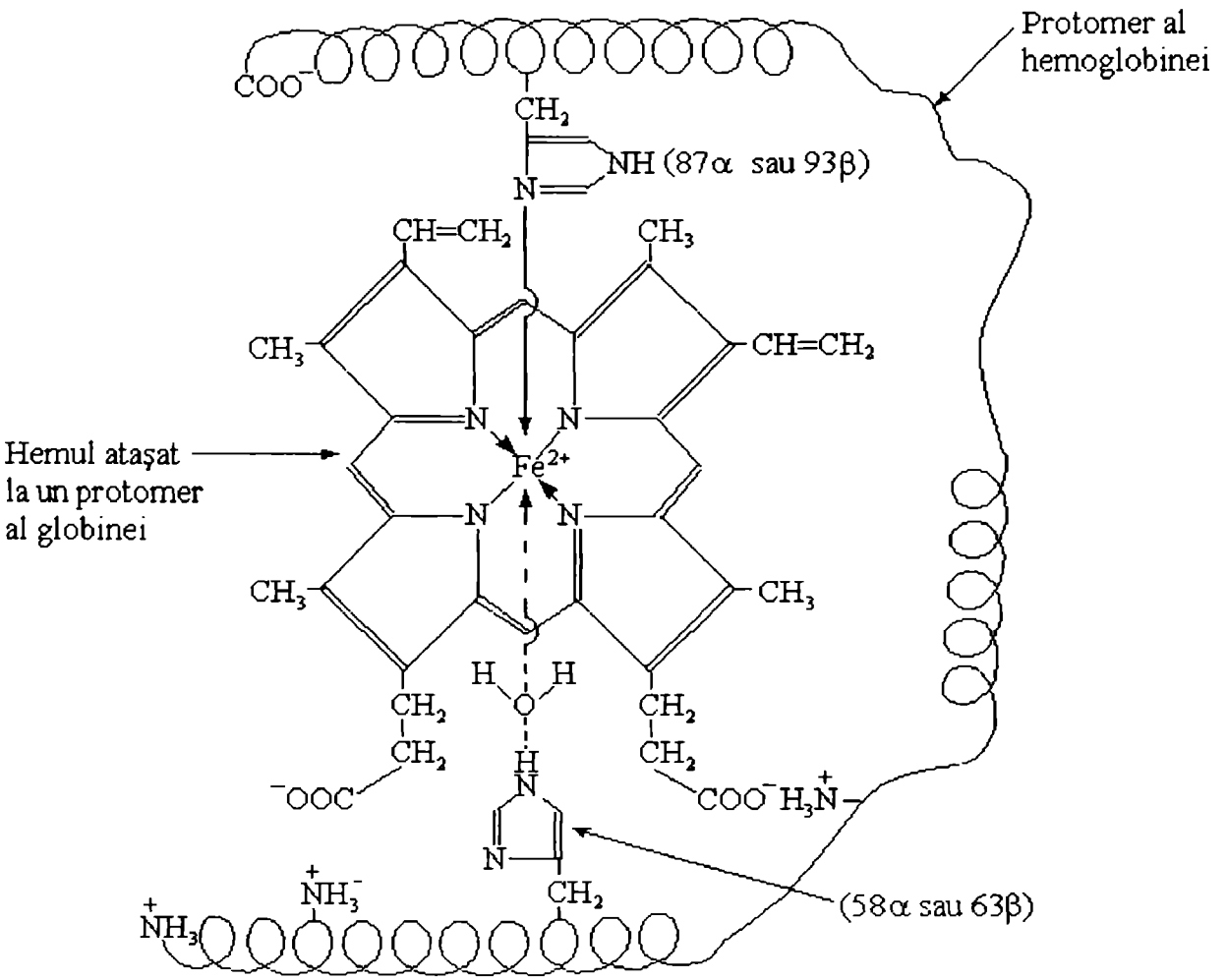


Fig.IV.24 – Modul de legare al hemului într-un protomer de hemoglobină activă

Protomerii de tip B conţin şi ei în secvenţă resturi de histidină, dar în poziţiile 63 şi 93, care, în mod asemănător protomerilor α, formează legături coordinative cu molecula de hem, la aceste poziţii.

De proteină, hemul se mai leagă prin:

-două legături ionice formate între grupele carboxilat ale resturilor de acid propionic şi grupele ε-amino protonate ale resturilor de lisină din lanţul protomerului;

-legături van der Waals, formate între radicalii metil din poziţiile 1, 3, 5, 8, radicalii vinil de la C_2, C_4 ai hemului şi resturile unor aminoacizi ca triptofanul şi fenilalanina din globină.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În calitate de componentă prostetică a hemoglobinei, hemul este acelaşi pentru toate speciile, în timp ce globina, componenta proteică, este specie specifică.

La vertebrate, hemoglobinele au mase moleculare de 50-68KDa, din care hemul deţine o pondere de 4% (fierului revenindu-i 0,33-0,34%), iar globina 96% din masa integrală.

Hemoglobinele sunt substanţe solide care cristalizează în sisteme diferite, în funcţie de specie, respectiv de particularităţile de compoziţie şi structură a globinelor constituente. Astfel. oxihemoglobina (HbO_2) de la om cristalizează în sistemul ortorombic bipiramidal, cea de cal în sistem monoclinic, cea de câine în sistem ortorombic, iar Hb de cobai în sistem tetraedric. De aceea, deosebirile între formele cristalografice permit stabilirea provenienţei hemoglobinelor, fapt pentru care această proprietate este benefică pentru laboratoarele de medicină legală şi criminalistică.

În grupa hemoglobinelor se constată o mare varietate structurală şi funcţională a membrilor săi. Aceasta din cauza existenţei mai multor tipuri de catene polipetidice în protomeri (α, β, γ, δ şi ε), care, asociaţi între ei în anumite proporţii, dau speciile moleculare de hemoglobină (A, E, F şi S). Catenele polipetidice mai bine studiate sunt cele pentru protomerii α şi β.

În ce priveşte speciile moleculare de hemoglobină generate de tipurile catenelor polipetidice pe care le conţin, se disting:

-hemoglobina A (HbA, hemoglobină la adult), cu structură tetramerică $\alpha_2\beta_2$; conţine doi protomeri de tip α şi doi de tip β. Biosinteza ei la om începe din a 25-a săptămână a vieţii intrauterine, progresând cantitativ, astfel că la naştere ajunge la 20%, după 6 luni la 90%, iar la vârsta adultă, la 99%.

-hemoglobina E (HbE, hemoglobină embrionară) apare în a 12-a săptămână de sarcină, cu structura tetramerică ε_4 (patru protomeri tip ε), care prin evoluţia sarcinii trece în structura $\alpha_2\varepsilon_2$.

-hemoglobina F (HbF, hemoglobina fătului), cu structură tetrameră $\alpha_2\gamma_2$, este prezentă atât în sângele fetusului în perioada de sarcină avansată cât şi al copilului nou născut, deţinând cca. 75% din hemoglobina totală. În continuare, HbF suferă progresiv modificări structurale pentru trecerea în HbA.

-hemoglobina S (HbS) este o hemoglobină anormală, care apare ca urmare a unei mutaţii genetice. Este deci o proteină mutantă, în care acidul gluatmic din poziţia 6 a protomerului β din hemoglobina A a fost înlocuit cu valina. Prin această înlocuire, se produce schimbarea sarcinii de suprafaţă a proteinei şi, implicit, a interacţiunii dintre subunităţi făcând ca ea să precipite (solubilitatea Hb mutante este mai mică în stare neoxigenată decât a Hb normale), formând cristale în formă de seceră, de unde şi denumirea de "hemoglobină S".

Restul de valină, introdus în poziţia 6, formează cu cel deja existent (Val) din poziţia 1, o asociaţie hidrofobă, care determină molecula hemoglobinei să ia o formă comprimată.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

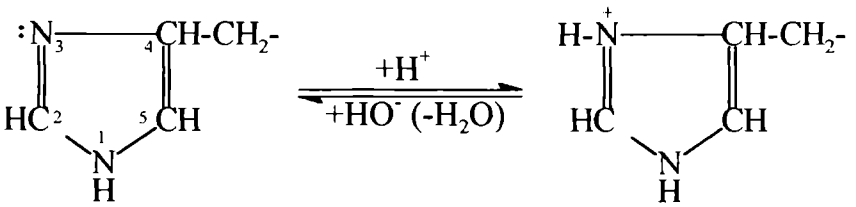
Se induce astfel şi deformarea eritrocitului, care capătă o configuraţie de seceră (la presiuni scăzute ale oxigenului) faţă de cea plată, discoidală, a hemoglobinei normale.

HbS este specifică anemiei falciforme, boală moleculară de origine genetică, determinată de o mutaţie în molecula ADN care codifică sinteza protomerului β din hemoglobină.

Rol biologic. Hemoglobina este pigmentul roşu din eritrocite şi îndeplineşte funcţia de transport a oxigenului molecular de la plămâni (alveole pulmonare) la ţesuturi (capilare tisulare) şi a dioxidului de carbon în sens invers, de la ţesuturi la plămâni, în organismele vertebratelor.

În plus, hemoglobina, prin componenta sa proteică, constituie un sistem tampon al sângelui, contribuind la menţinerea echilibrului acido-bazic.

Funcţia tampon a hemoglobinei se datorează numeroaselor resturi de histidină din structura sa, care manifestă proprietăţi tampon în jurul pH-ului fiziologic (7,4 în sânge), prin acceptare sau cedare de protoni, la atomul de N din poziţia 3 a nucleului imidazolic:



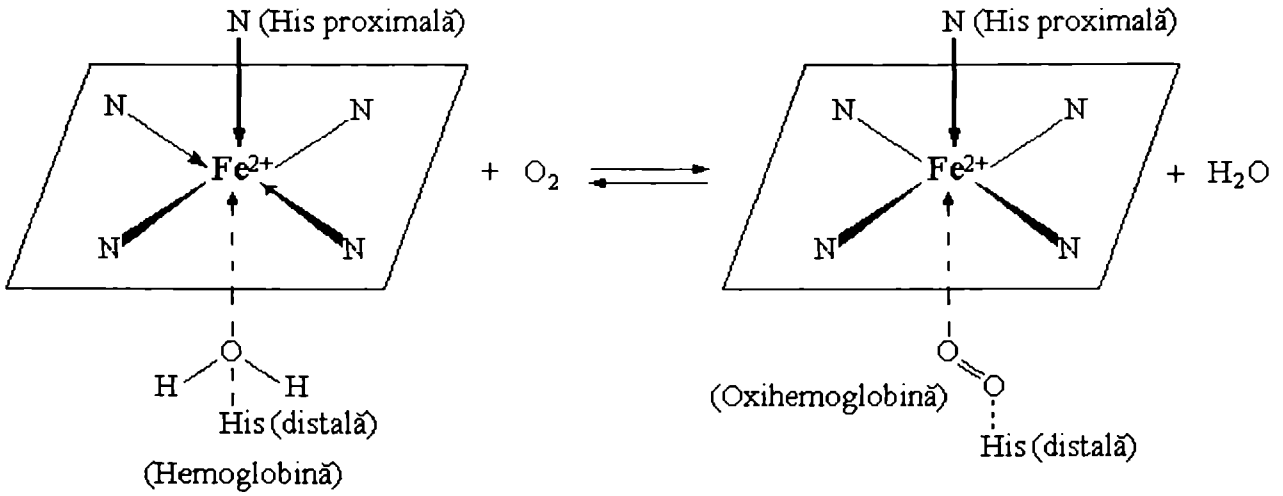
Rolul hemoglobinei, de transportor al oxigenului, se datorează proprietăţii sale de a fixa, reversibil oxigenul molecular în funcţie de presiune, proprietate vitală pentru organismul animal:

$$\underset{\text{(Hemoglobină)}}{Hb} + O_2 \rightleftharpoons \underset{\text{(Oxihemoglobină)}}{HbO_2}$$

Astfel, în plamâni, unde presiunea parţială a oxigenului este mare, echilibrul reacţiei se deplasează spre dreapta, formându-se oxihemoglobina, care este apoi transportată pe cale circulantă la ţesuturi. Aici, presiunea parţială a oxigenului fiind mică, echilibrul reacţiei se deplasează spre stânga, eliberând oxigenul necesar oxidărilor celulare.

Fixarea reversibilă a oxigenului se produce la nivelul ionului central Fe^{2+}, cu substituirea moleculei de apă, conform reacţiei:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Aşa se produce oxigenarea hemoglobinei la nivelul unui protomer. Cum Hb este o proteină tetrameră, oxigenrea reversibilă a ei decurge treptat, printr-un şir de reacţii, la capătul căruia oxigenarea maximală are ca rezultat fixarea a patru molecule de oxigen.

$$Hb \overset{O_2}{\rightleftharpoons} HbO_2 \overset{O_2}{\rightleftharpoons} Hb(O_2)_2 \overset{O_2}{\rightleftharpoons} Hb(O_2)_3 \overset{O_2}{\rightleftharpoons} Hb(O_2)_4$$

Funcţia hemoglobinei este reglată în acest caz printr-un mecanism alosteric, asemănător celui de la enzimele reglatoare. Întrucât hemoglobina şi mioglobina au în privinţa transportului de oxigen funcţii oarecum asemănătoare, curbele lor de oxigenare (determinate experimental) vor fi prezentate pentru comparaţie împreună în fig.IV.25.

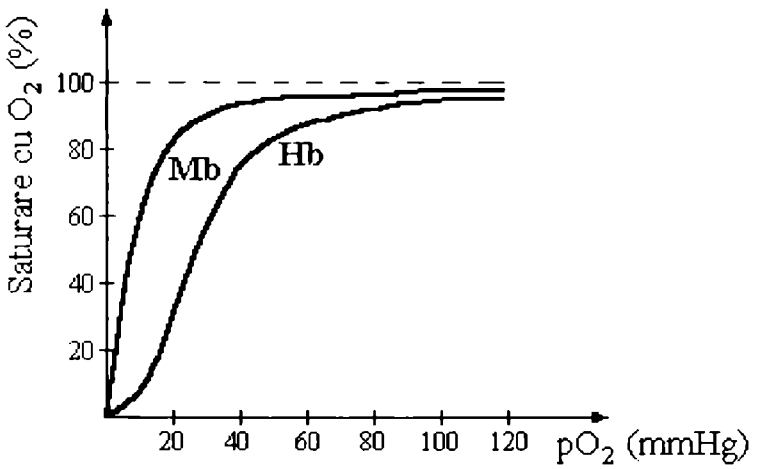


Fig.IV.25 – Curbele de oxigenare ale hemoglobinei (Hb) şi mioglobinei (Mb); pO_2=presiunea parţială a O_2

Structural şi principial, aceste două proteine diferă între ele, molecula mioglobinei fiind monomeră (asemănătoare numai cu unul dintre protomerii Hb), iar hemoglobina, tetrameră.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Prin aceasta, mioglobina având o singură grupă hem, fixează numai o moleculă de O_2 şi prezintă o curbă de oxigenare hiperbolică, față de hemoglobină (cu patru grupe hem), care fixează patru molecule de O_2, aspectul curbei de oxigenare a ei fiind sigmoidal.

La început, acceptarea O_2 de către hemoglobină este neînsemnată, însă se accentuează cu creşterea presiunii acestuia.

La fixarea oxigenului, fierul din hemoglobină nu îşi schimbă valența, rămânând sub forma Fe^{2+}. Legătura coordinativă dintre Fe^{2+} şi atomul de N al restului de histidină distal (aparținând globinei), mijlocită de o moleculă de apă, se desface şi se reface cu oxigenul molecular, producând oxihemoglobina.

S-a observat că cei patru protomeri ai Hb nu fixează O_2 cu aceeaşi viteză şi că există o influență din partea unor protomeri asupra celorlalți.

Unitatea funcțională (dimerul α, β) din Hb tetrameră fixează O_2 pe protomerul său α, producându-i modificări conformaționale discrete. Aceste modificări se explica prin faptul că Hb deoxigenată se află în stare tensionată (stare T, având afinitate redusă față de O_2), caracterizată printr-un număr maxim de interacții inter- şi intracatenare. Tot în această stare, ionul Fe^{2+} (pentacoordinat) din fiecare protomer este deviat de la planeitatea porfirinei cu 0,075nm, ca o consecință a legăturii sale cu histidina proximală (fig.IV.26).

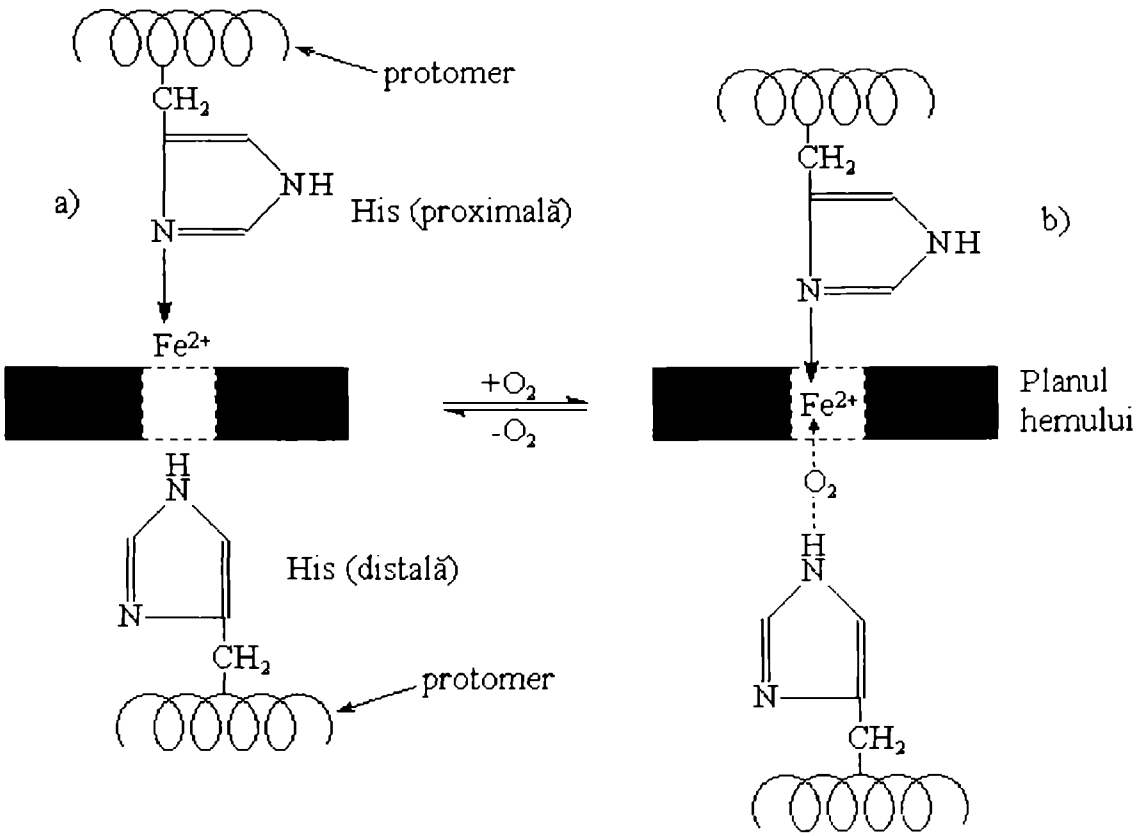


Fig.IV.26 – Poziția Fe^{2+} față de planul hemului într-un protomer al hemoglobinei a)neoxigenată; b)oxigenată

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Protomerul α determină la rândul său producerea unor modificări asemănătoare în protomerul β, care va accepta cu mai mare uşurinţă o moleculă de O_2. Dimerul dioxigenat rezultat va determina modificări conformaţionale protomerilor (α, β) ai celuilalt dimer, care va accepta şi el cu uşurinţă două molecule O_2, ducând la saturarea Hb.

O inversare a situaţiei se produce în cazul reacţiei de disociere a Hb total oxigenată, când pierderea unei molecule de O_2 face ca restul (celelalte) să se disocieze mult mai uşor, când presiunea oxigenului scade.

S-a observat că afinitatea Hb pentru legarea O_2 este dependentă de numărul moleculelor de O_2, cu care s-a combinat deja, crescând odată cu el. Fenomenul invers, de eliberare a fiecărei molecule de O_2 legate din oxihemoglobină slăbeşte legătura din celelalte molecule, favorizând descompunerea.

Deosebit de interesantă este şi influenţa pH-ului asupra legării O_2 sau altor liganzi la Hb, concretizată prin efectul Bohr (alcalin peste pH≈6 şi acid – sub pH≈6).

Efectul Bohr alcalin se produce când afinitatea Hb faţă de liganzi (de exemplu, a O_2 pentru formarea HbO_2) creşte paralel cu pH-ul, favorizând asocierea şi efectul Bohr acid, când afinitatea faţă de ligand se manifestă în sens invers, favorizând reacţia de disociere ($HbO_2 \rightleftharpoons Hb + O_2$). Spre exemplu, scăderea pH-ului în domeniul fiziologic prin acizii lactic, carbonic şi produşii de oxidare a substanţelor alimentare (care eliberează H^+), deplasează curba de disociere a HbO_2 spre dreapta, dovedind scăderea afinităţii Hb pentru O_2 şi, deci cedarea O_2 din HbO_2.

Fenomenul poate fi uşor de înţeles prin reprezentarea variaţiei curbelor de saturaţie a Hb cu O_2 la pH-uri apropiate celui fiziologic (fig.IV.27).

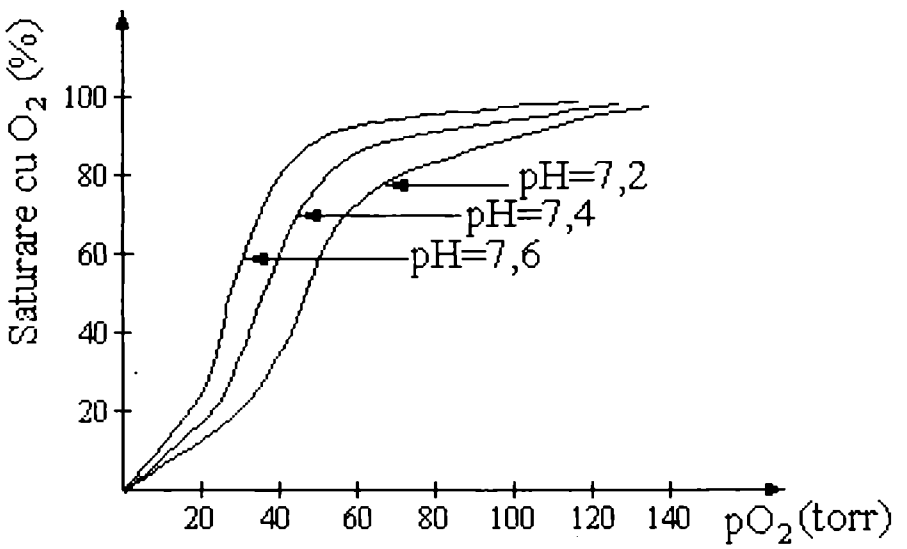


Fig.IV.27 – Deplasarea curbei de oxigenare a Hb în funcţie de pH

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Prin oxigenare (trecerea la oxihemoglobină), ionul Fe^{2+} nu-şi schimbă valenţa, devine hexacoordinat şi intră în planul hemului, iar molecula O_2 se plasează între acest plan şi histidina distală a protomerului.

Prin intermediul restului distal de histidină, astfel ancorat la hem, sunt antrenate modificări în structura secundară şi terţiară a protomerului α (care se transmit până la nivel cuaternar). Hb trece în stare R (relaxată), cu afinitate mare pentru O_2, în urma tranziţiei T→R.

Procesul de acceptare a oxigenului, precedat de labilizarea protomerilor, este reflectat de aspectul sigmoidal al curbei, spre deosebire de saturarea cu oxigen a mioglobinei, care se face proporţional cu concentraţia de O_2 din mediu, luând forma unei hiperbole (fig.IV.25).

Alţi derivaţi ai hemoglobinei. La nivel tisular, unde presiunea parţială a CO_2 este mare, Hb eliberată de O_2 fixează reversibil la grupele α-amino libere dioxidul de carbon rezultat din oxidările celulare, formând CARBHEMOGLOBINA (reacţia a), care este vehiculată apoi prin circuitul sanguin la plămâni. Aici, din cauza presiunii parţiale mici a CO_2 sunt create condiţiile deplasările echilibrului de reacţie spre stânga (reacţia b):

$$\underset{\text{(Hemoglobină)}}{Hb\text{-}NH_2} + CO_2 \underset{b}{\overset{a}{\rightleftharpoons}} \underset{\text{(Carbhemoglobină)}}{Hb\text{-}NH\text{-}COO^-} + H^+$$

Dioxidul de carbon eliberat se elimină din plămâni, încheindu-se ciclul respirator. Hemoglobina regenerată devine aptă pentru a începe un nou ciclu de transport al oxigenului.

Interacţia hemoglobinei cu alte substanţe. Unele substanţe cu moleculele mici ca: CO, NO şi H_2S, coordinează la a 6-a poziţie de ligand a Fe^{2+} din Hb (şi Mb), cu o afinitate mult mai mare decât O_2. Având în vedere şi legarea lor asemănătoare la hemul din citocromi, se poate înţelege toxicitatea deosebit de mare a acestor compuşi.

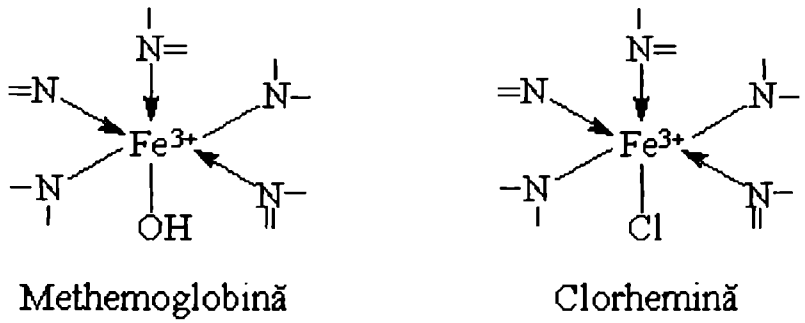
Cu CO de exemplu, Hb se combină de 200 ori mai uşor decât cu O_2, formând CARBOXIHEMOGLOBINA (HbCO), un compus mai stabil decât HbO_2. Prin afinitatea mult mai mare a Hb pentru CO decât pentru O_2, CO se fixează ireversibil la ionul Fe^{2+} din hem, împiedicând formarea HbO_2. Se blochează astfel funcţia respiratorie a Hb, producându-se intoxicaţii grave. Când cantitatea de HbCO în sânge depăşeşte 50% din totalul Hb, semnele de intoxicaţie (cefalee, slăbiciune musculară, ameţeli, greaţă etc.) se agravează, individul putând intra în comă şi chiar deceda prin asfixie. Pentru a favoriza disocierea HbCO şi formarea HbO_2 este necesar un aport crescut de O_2 (presiune parţială mare a O_2) prin instalaţii cu O_2, la o presiune corespunzătoare.

Produsele rezultate la combinarea Hb cu gazele dau spectre de absorbţie caracteristice, care permit identificarea lor.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În procesul absorbție – desorbție normală a O_2, fierul din Hb nu-şi schimba valența, rămânând constant ca Fe^{2+}. Sub acțiunea fericianurii de potasiu şi a altor agenți oxidanți, Fe^{2+} din Hb (culoare roşie) trece în Fe^{3+} din methemoglobină (culoare brună), pierzându-şi proprietatea de a fixa reversibil oxigenul molecular.

În methemoglobină, Fe^{3+} se află legat de grupa –OH, blocând posibilitatea de a fixa O_2 (firg.IV.28).



Methemoglobină Clorhemină

Fig.IV.28 – Structurile simplificate ale methemoglobinei şi clorheminei

La nivelul eritrocitelor, se formează în mod continuu methemoglobină (met-Hb), dar este redusă foarte rapid de două sisteme enzimatice – methemoglobin reductaze – determinând deplasarea puternică a echilibrului Hb $\rightleftharpoons$ met-Hb spre stânga şi nepermițând o creştere a met-Hb mai mare de 0,4% din Hb totală.

Prima şi cea mai importantă reductază având denumirile NADH – methemoglobin reductaza I, diaforaza, diaforaza I etc., are coenzima NADH (format în glicoliza anaerobă) şi reduce 70% din met-Hb formată. A doua enzimă NADPH – methemoglobin reductaza II, numită şi diaforaza II, are coenzima NADPH (format la metabolizarea oxidativă a glucozei prin ciclul pentozofosfaților) şi produce reducerea intercorpusculară a 5% din met-Hb. La reducerea met-Hb mai participă vitamina C şi glutationul.

Modificarea genetică a structurii şi concentrației mthemoglobinreductazelor are ca urmare producerea methemoglobinemiilor congenitale, prin deficit enzimatic, din cauza acumulărilor de met-Hb produsă şi neredusă.

Methemoglobina poate apărea în cantități mari în sânge în urma unor intoxicații cu compuşi chimici oxidanți, unele medicamente, pesticide, dereglări genetice care modifică secvența de aminoacizi din protomerii α şi β ai globinei etc.

Un alt derivat al hemoglobinei având fierul în stare trivalentă este clorhemina, în care anionul Cl^- se leagă la atomul central (fig.IV.28).

Transformarea hemului în clorhemină se produce sub acțiunea NaCl (sau HCl) în acid acetic. Reacția este foarte sensibilă, are ca rezultat formarea unor cristale caracteristice (cristale Teichman) şi se utilizează pentru identificarea urmelor de sânge.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Mioglobina (Mb). Este o cromoproteină globulară de culoare roşie. Conţine 153 resturi de aminoacizi dispuşi într-o singură catenă, care se leagă de o grupă hem, identică cu hemul din hemoglobină (fig.IV.24). Structura secundară a Mb prezintă 70% porţiuni spiralate (α-helix), care alternează cu porţiuni nespiralate, randomizate, în proporţie de 30% (fig.IV.12).

În scheletul molecular al Mb există 8 segmente relativ drepte (formate din (α-helix de dreapta), unite între ele prin porţiuni curbate, nespiralate. Fragmentele drepte conţin între 7 şi 23 aminoacizi. Segmentele de curbură conţin aminoacizi helix deformatori (prolina) şi helix destabilizatori (Ser, Ile etc.). Existenţa acestor segmente permite împachetarea catenei proteice într-o structură terţiară foarte compactă, cu aceeaşi conformaţie pentru toate moleculele, în interiorul căreia rămâne spaţiu numai pentru patru molecule de apă.

Molecula Mb are masa de 17KDa şi se aseamănă în structură terţiară cu lanţurile α şi β ale Hb, considerându-se precursorul ancestral al acestora.

Mioglobina se găseşte în celulele muşchilor scheletici, cărora le imprimă culoare roşie.

Rol biologic. Rolul Mb constă în depozitarea O_2 în ţesutul muscular, constituind în acelaşi timp forma de rezervă a O_2 necesar oxidărilor celulare; constituie un depozit de O_2 în muşchi, care se utilizează pe parcursul unui efort prelungit. Concomitent, Mb măreşte posibilitatea de difuzie a O_2 în celulele musculare.

Pentru a îndeplini aceste funcţii, Mb se asociază reversibil cu oxigenul molecular sub formă de oximioglobină (MbO_2), formă sub care acesta este stocat în ţesutul muscular şi cedat celulei conform reacţiei:

$$Mb + O_2 \rightleftharpoons MbO_2$$
(Oximioglobină)

Procesul absorbţiei şi saturării Mb cu O_2 este prezentat în fig.IV.25, comparativ cu Hb.

Afinitatea Mb faţă de O_2 este de 6 ori mai mare decât afinitatea Hb şi se asociază cu O_2 la presiuni mult mai mici decât aceasta din urmă. Spre exemplu, la presiunea sângelui venos, Mb ajunge la o saturaţie de 95% în oxigen.

Cantităţi însemnate de Mb se găsesc în muşchii striaţi cu activitate intensă (de exemplu, din membrele superioare şi inferioare) şi în miocard, având activitate continuă şi bioritmică.

Muşchii unor animale marine ca: foca, morsa, balena etc.conţin o cantitate mare de Mb, ceea ce explică şederea lor sub apă un timp mai îndelungat.

Ca şi Hb, în cursul funcţionării normale, când O_2 este prins şi desprins, Fe^{2+} din Mb nu-şi schimbă valenţa. Totuşi, sub acţiunea unor agenţi oxidanţi, ca fericianura de potasiu, Mb este oxidată la metmioglobină (de culoare brună). Metmioglobina conţine Fe^{3+} şi se aseamănă structural cu methemoglobina (fig.IV.28), pierzându-şi capacitatea de a lega O_2.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Citocromi. Sunt substanțe organice din categoria cromoproteinelor cu rol respirator. Denumirea lor provine de la cuvintele greceşti "kytos" (celulă) şi "chroma" (culoare).

Structură. Citocromii sunt proteine conjugate, cu proprietăți catalitice, care au ca parte prostetică hemul (sau derivați ai hemului) şi al căror mecanism de acțiune se bazează pe proprietatea ionului de fier central de a-şi schimba reversibil valența, prin cedare sau primire de electroni.

$$\text{cit } Fe^{2+} \underset{+e^-}{\overset{-e^-}{\rightleftharpoons}} \text{cit } Fe^{3+}$$

În acelaşi timp, sinergetic, are loc şi protonarea (prin eliberarea de H^+), anionul HO^- stabilizând temporar structura heminică a citocromului:

$$\text{cit } Fe^{2+} : OH_2 \underset{+H^+}{\overset{-H^+}{\rightleftharpoons}} \text{cit } Fe^{3+} : OH^-$$

În afară de reprezentanții tipici ai citocromilor, mai sunt incluşi în categoria lor şi alți derivați care se abat, mai mult sau mai puțin, de la aceste însuşiri. Exemple dintre aceştia sunt: citocromul a_3, care conține cupru în loc de fier, citocromul b_2, care conține flavină în loc de hem şi citocromul P-450 (descoperit în 1955), care corespunde altor caracteristici (de exemplu, absoarbe specific la λ=450nm).

Diferențele care apar între reprezentanții grupei citocromilor se referă la:

1)structura părții proteice, structura părții prosteice, natura legăturii dintre aceste părți, absorbția caracteristică a luminii la diverse lungimi de undă şi

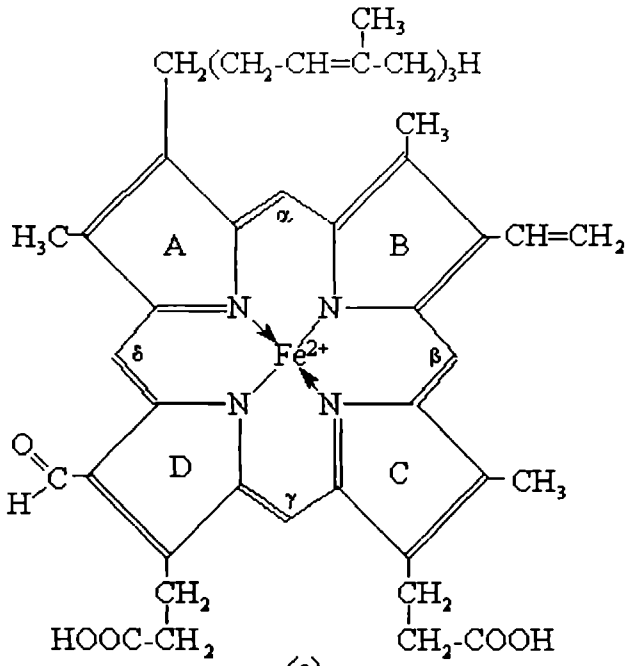
2)locul pe care îl ocupă în secvența de respirație celulară.

Prin cercetări spectroscopice s-a constatat că citocromii nu au o structură unitară, ei constând în realitate dintr-un amestec de 3-4 substanțe cu structuri asemănătoare. Există unele modificări atât în componenta proteică cât şi în cea prostetică.

Componenta proteică a citocromilor are un rol însemnat şi în privința masei moleculare, care variază în limitele 13-170KDa.

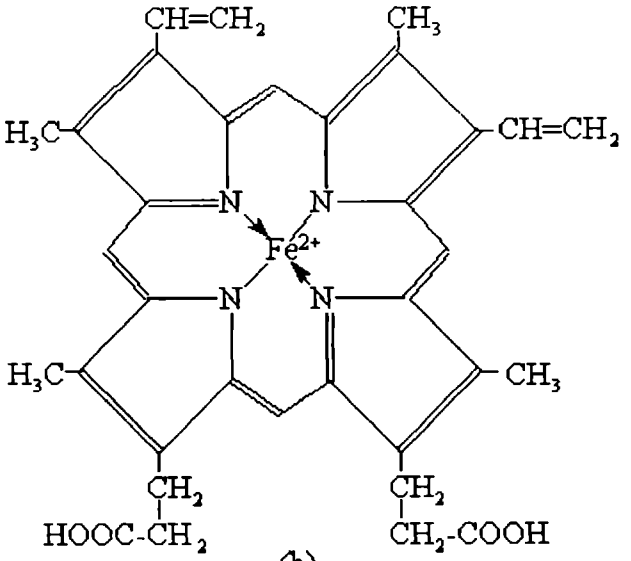
Componenta prostetică este asemănătoare, însă manifestă unele diferențe de la caz la caz, apărând ca un element caracteristic al speciilor moleculare principale de citocromi, notate cu a, b, c şi d (fig.IV.29).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



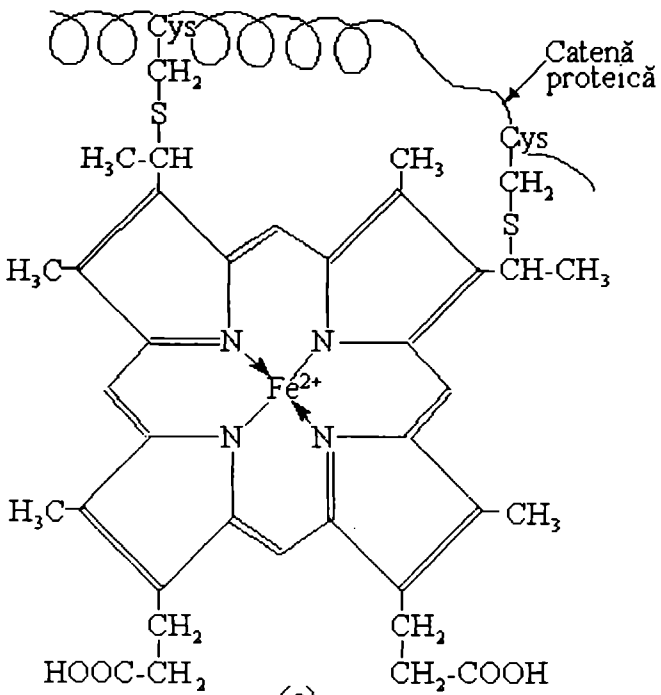
(a)

Fe-formilporfirina
(Hem a, în citocromi a)



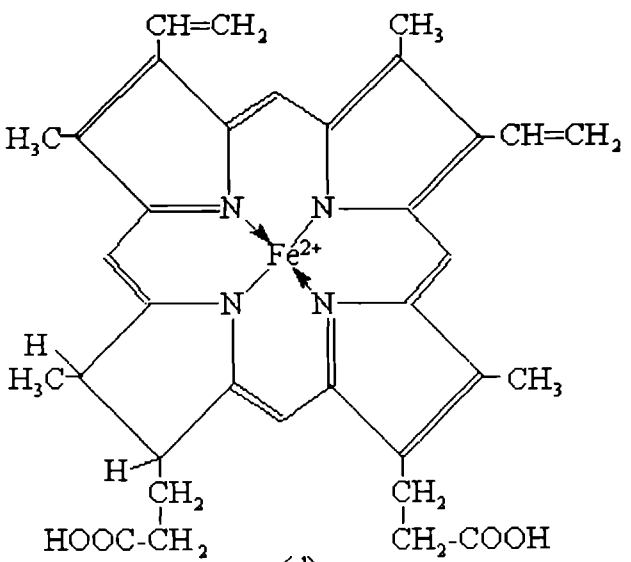
(b)

Fe-protoporfirina
(Hem b, în citocromi b)



(c)

Fe-mezoporfirina substituită (Hem c)
legată covalent cu proteina (în citocromi c)



(d)

Fe-dihidroporfirina
(Hem d, în citocromi d)

Fig.IV.29 – Structura părții prostetice a citocromilor a, b, c și d

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Clasificarea citocromilor se realizează pe baza benzilor de absorbție caracteristice în spectrul vizibil al formei lor reduse, coroborate cu structura părții prostetice, modul ei de legare cu partea proteică și potențialele redox (tabelul IV.12).

Tabelul IV.12 – Denumirile și unele caracteristici structurale și funcționale ale principalilor citocromi

Caracteristici / Citocromi	Masă moleculară (KDa)	Potențial redox (V)	Redus de:	Oxidat de:
a	240	+0,28	cit. c	cit. a_3
a_3		+0,30	cit. a, c	oxigen
b	30	+0,05	coenz. Q	cit. c_1
c	13	+0,26	cit. c_1	cit. a-a_3
c_1	370	+0,23	cit. b	cit. c

În forma redusă, fiecare tip de citocrom are în regiunea vizibilă a spectrului trei benzi de absorbție notate cu α, β și γ, numite benzile Soret.

Un exemplu pentru spectrul de absorbție în vizibil, cu evidențierea acestor benzi este reprezentat în fig.IV.30, pe citocromul c; pentru comparație cu ceilalți citocromi, vezi tabelul IV.13.

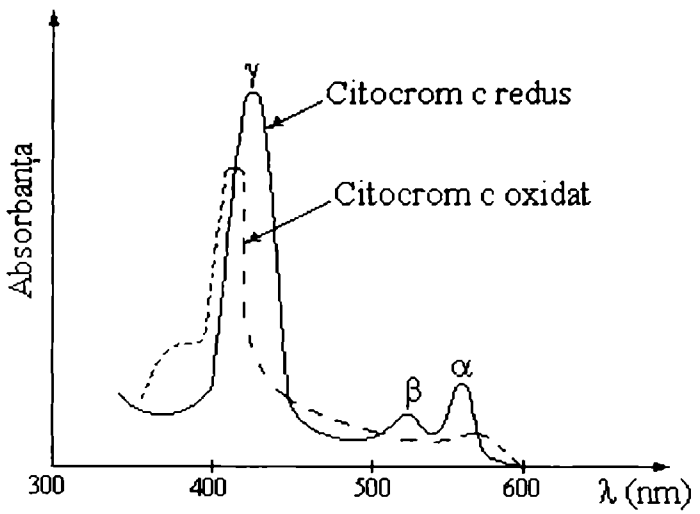


Fig.IV.30 – Benzile de absorbție caracteristice în spectrul vizibil ale citocromului c

Valorile acestor benzi sunt prezentate în tabelul IV.13, împreună cu datele corespunzătoare și altor citocromi.

Lungimea de undă a vârfului α variază caracteristic cu speciile reduse ale tipurilor de citocromi și este folosită la diferențierea lor. Pentru citocromii aflați în stare oxidată, această bandă de absorbție dispare, așa cum se observă din fig.IV.30.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabelul VI.13 – Maximele de absorbție spectrală a citocromilor (în nm)

Benzile Soret / Citocromi	α	β	γ
a (redus)	600		439
a_1 (azobacter)	589		
a_2 (microorganisme)	628		
a_3	603		443
b	563	532	429
c	550	521	415
c_1	554	524	418

Se consideră trei grupe principale de citocromi (a, b şi c), iar particularizarea membrilor fiecărei grupe se face prin indicii numerici (de exemplu, a_3, b_1, b_5, c_1) sau, mai nou, prin banda de absorbție spectrală α, caracteristică, cum este cazul citocromilor P_{450}, b_{562}, b_{560} etc.

Citocromii sunt prezenți în organitele celulare (de exemplu, microzomi şi mitocondrii) din toate celulele animale şi vegetale şi participă la reacțiile de transfer de electroni.

Cu excepția citocromului c, ceilalți citocromi sunt strâns legați de membrana mitocondrială, motiv pentru care sunt foarte greu de obținut în stare solubilă şi de purificat.

În afară de citocromii găsiți în membrana internă mitocondrială, s-a găsit în reticulul endoplasmatic şi un citocrm de alt tip – citocromul b_5.

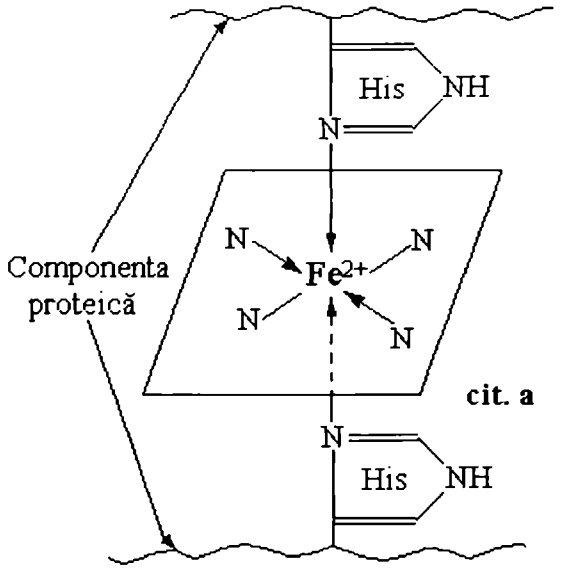
A.Citocromii a. Reprezintă o specie moleculară constituită dintr-o proteină fieroporfirinică, cu masa moleculară de 70KDa. Au drept parte prostetică hemul a (fig.IV.29a), asociat cu partea proteică prin legături necovalente.

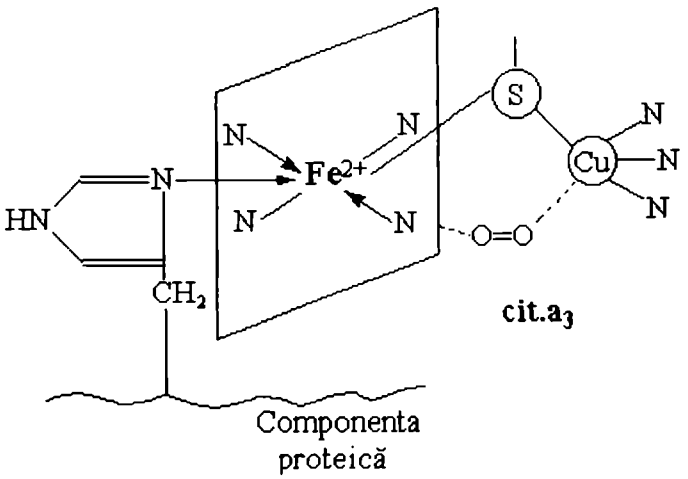
Hemul a se deosbeşte de protohem (hemul b) având înlocuit radicalul metil din poziția 2 cu o catenă izoprenoidică, hidrofobă, formată din 17 atomi de carbon.

Spectrele de absorbție înregistrate pe fragmente de membrană internă mitocondrială au scos în evidență prezența a doi citocromi: a şi a_3, care nu au putut fi separați unul de celălalt. Ei alcătuiesc împreună o proteină unică, citocrom-c-oxidază (enzima respiratorie), singura dintre componentele lanțului respirator capabilă să reducă oxigenul, cunoscut fiind faptul că citocromii a se caracterizează prin potențialul redox cel mai înalt.

Totuşi, în această entitate, cei doi citocromi se manifestă diferit în anumite proprietăți. Citocromul a, la fel cu citocromul c, nu reacționează cu O_2, CO şi ionul CN^-. În schimb, citocromul a_3 reacționează cu O_2 (se autooxidează), fierul din molecula sa reacționează cu CO şi cu ionul CN^-, fiind deci sensibil la toxicele respiratorii. Acest comportament este în concordanță cu structura citocromilor implicați în respectivul complex, având în vedere şi faptul că interacția în ansamblul său, are nevoie şi de prezența cuprului:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro





Grupele hem din structura citocromilor a şi a_3 sunt identice din punct de vedere chimic, însă, faţă de anumţi liganzi, reactivitatea lor diferă.

Complexul format din cei doi citocromi (a şi a_3) se mai numeşte şi citocrom aa_3, are o masă moleculară de cca. 200KDa şi coţine două molecule hem a şi doi atomi de cupru.

B.Citocromii b. Constituie o categorie de mai mulţi compuşi proteici fieroporfirinici, având ca grupă prostetică hemul b (fig.IV.29b), similar celui întâlnit în Hb şi Mb. Legătura între acesta şi partea proteică este de natură necovalentă.

Reprezentanţi din această grupă au fost decelaţi în mitocondrii, microzomi, drojdia de bere şi E. coli.

Diversitatea structurală a reprezentanţilor grupei este generată de partea proteică, ceea ce se poate observa şi din marea variabilitate a maselor moleculare, cuprinse în limitele 30-170KDa.

Ca şi citocromii a, în citocromii b liganzii axiali (5 şi 6) la atomul Fe^{2+} central sunt resturi de histidină din componentă proteică, fapt pentru care sunt neautooxidabili şi nu reacţionează cu CO şi CN^-.

Citocromul b. Este o proteină fieroporfirinică, strâns legată de membrana interioară a mitocondriilor. Secvenţa de aminoacizi a citocromului b, care este codificată de ADN mitocondrial, a fost dedusă din secvenţa bazelor azotate ale acestuia.

Citocromul b are un potenţial redox scăzut, se situează în lanţul respirator între ubichinonă şi citocromul c şi participă în oxidarea succinatului şi NADH.

Citocromul b_1. Este o hemoproteină tetrameră, cu masa moleculară de 265KDa. A fost izolată din E. coli şi are activitate de piruvat dehidrogenază.

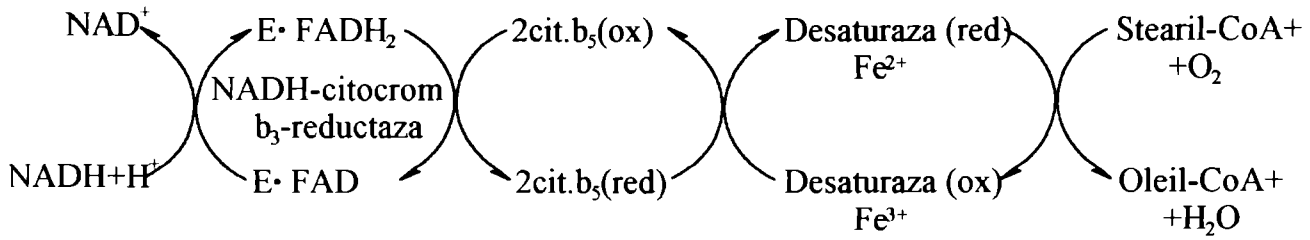
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Citocromul b_2. A fost identificat în drojdia de bere şi are rol în acţiunea lactat dehidrogenazei. Se disociază în subunităţi sub acţiunea clorhidratului de guanidină şi a dodecilsulfatului de sodiu.

Citocromul b_3. Se întâlneşte în reticulul endoplasmatic neted, unde are rol în transportul de electroni.

Citocromul b_5. Este prezent în microzomii multor organe, în special în ficat, dar şi legat de membrana mitocondrială, tot în ficat. Din punct de vedere structural, apare ca o hemoproteină oligomeră, cu masa moleculară de 120KDa. Fiecare monomer are 126 resturi de aminoacizi şi corespunde unei mase moleculare de cca. 16KDa.

Citocromul b_5 face parte dintr-un minisistem de transport de electroni, cuplat cu încă două protein-enzime (desaturaza şi NADH-citocrom b_5 reductaza) implicate în procesul de desaturare a acizilor graşi saturaţi:



Reacţiile cu transfer de electroni prin intermediul acestui complex enzimatic se produc la suprafaţa interioară a membranei reticulului endoplasmatic şi deci nu se asociază cu fosforilarea oxidativă.

Citocromul P_{450}. Face parte din grupa citocromilor b şi se numeşte astfel după maximul de asorbţie de la 450nm a derivatului său cu CO (P=pigment). Are masa moleculară 850KDa, structură oligomerică, formată din 16 subunităţi identice, corepunzând fiecare masei de 53KDa şi conţine 8 grupe hem.

P_{450} este un citocrom microzomal specializat şi face parte, împreună cu o flavoproteină numită NADPH-citocrom P_{450} reductaza, dintr-un sistem microzomal hepatic de transport al electronilor din ficat, pentru hidroxilarea substratelor organice. Are o funcţie importantă în procesele metabolismului celular. la parte la procesul de oxidare şi de hidroxilare a hidrocarburilor alifatice şi aromatice, sterolilor, medicamentelor cu nucleu aromatic etc.

C.Citocromii c. Structural, citocromii c se deosebesc de toţi ceilalţi compuşi din clasa citocromilor prin modul de legare a hemului la partea proteică. Legăturile între aceste componente sunt covalente, de tip tioeter, formate prin reacţii de adiţie a grupelor –SH din resturile de cisteină din poziţiile 14 şi 17 ale lanţului proteic la radicalii vinil (la C_2 şi C_4) ai hemului (fig.IV.29c). Ionul Fe^{2+} central este hexacoordinat. Dintre cele şase legături coordinative, patru sunt la atomii de azot pirolici ai macrociclului porfirinic şi două axiale, perpendiculare pe planul lor. Dintre cele două legături axiale, una se formează cu atomul de S al Met (80) şi cealaltă printr-un atom de N al nucleului imidazolic din His (18).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

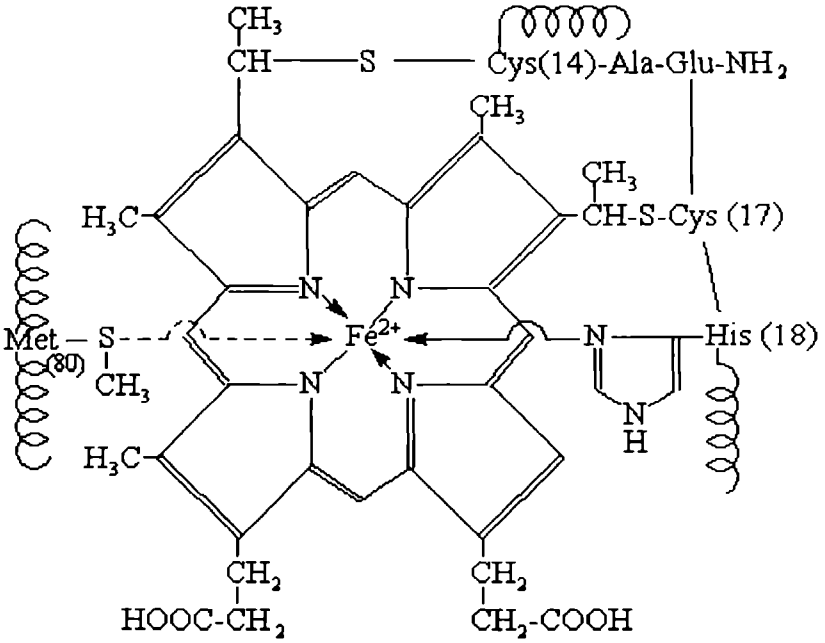


Fig.IV.31 – Structura citocromului c şi c_1

Structura acestei părți centrale apare invariabil în toate subtipurile de citocrom c. În schimb, partea proteică diferă mult de la un subtip la altul.

Citocromul c este una dintre proteinele cele mai mult studiate. A fost izolat din mitocondriile celulelor animale şi vegetale, precum şi din bacterii.

Se găseşte în cantități mari în muşchiul cardiac (şi, în ordine descrescătoare, în rinichi, ficat, muşchiul scheletic) ca şi în muşchii implicați în zborul păsărilor. Din aceste produse, citocromul c se extrage cu uşurință, pe baza unei mult mai bune solubilizări din structurile mitocondriale decât ceilalți citocromi, a unei mai mari stabilități față de acizi şi baze, precum şi a unei mai bune termostabilități.

Specia moleculară a citocromilor c cuprinde mai multe subtipuri, dintre care mai cunoscute sunt:

-citocromul c_1, prezent în mai multe formațiuni subcelulare şi, mai ales, în mitocondriile celulelor eucariote. Este strâns legat de membrană şi participă în lanțul transportorilor de electroni şi de hidrogen, făcând legătura între citocromii b şi c. Citocromul c_1 apare în cantități mai mici în mitocondrii decât citocromul c şi este component al citocrom c-reductazei. Citocromul c_1 are spectrul de absorbție asemănător cu al citocromul c, masa moleculară mai mare (37KDa) şi o mai bună rezistență față de agenții de solubilizare. Nu poate înlocui citocromul c în reacțiile enzimatice specifice.

-citocromul c_2, din bacteriile fotosintetizante, cu o grupă prostetică şi o slabă activitate redox;

-citocromul c_3 se găseşte în bacteriile fotosintetizante, tiobacterii, algele brun-albastre şi conține mai multe grupe prostetice;

-citocromul c_5, din bacterii ale genului Azobacter;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

-citocromul c_6, din cloroplaste şi membranele celulelor vegetale şi

-citocromul c_{559}, din celulele plantelor superioare, care intervine în transportul de electroni în procesul fotosintezei.

Multitudinea legăturilor care se stabilesc prin interacţia diverselor grupe funcţionale din partea proteică în jurul hemului c sunt de o importanţă covârşitoare pentru structura şi funcţia sa. Se structurează o conformaţie specială, în care se aranjează rigid hemul în lanţul proteic şi se îmbracă de aşa manieră încât numai o parte a acestuia rămâne neacoperită. Astfel protejat, Fe^{2+} din citocromul c nu reacţionează cu oxigenul (prin autooxidare) şi nici cu toxicele respiratorii (CO şi CN^-). În lanţul respirator însă, este redus de flavoproteina citocrom-c-reductaza sau oxidat în reacţie cu O_2 de citocrom-oxidază.

Funcţia biologică principală a citocromului c constă în reoxidarea coenzimei Q din lanţul transportorilor de hidrogen şi electroni din mitocondrie.

D.Citocromii d. Date referitoare la acest citocrom sunt puţine în literatura de specialitate.

Citocromul d este o proteină conjugată, având ca grupă prostetică hemul d (fig.IV.29d) şi prezintă înrudiri structurale cu hemul b.

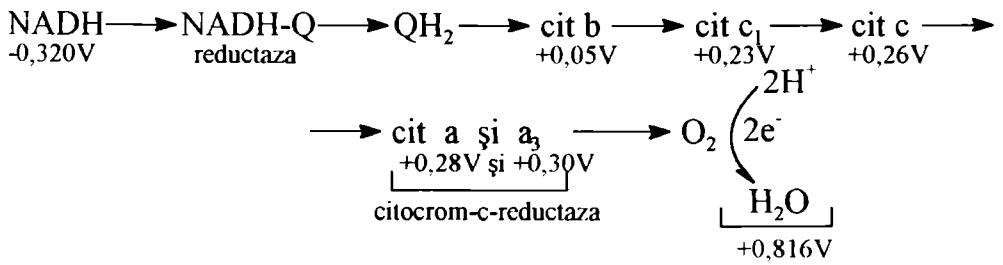
Rolul biologic al citocromilor constă în participarea lor în lanţul respirator şi fosforilarea oxidativă.

În lanţul respirator, fiecare citocrom acţionează prin acceptarea electronilor de la un partener care are un potenţial redox standard mai negativ (electropozitiv mai mic) decât al său şi cedarea lor unui partener cu potenţial electronegativ mai mic (electropozitiv mai mare). În acest proces, citocromii îşi schimbă alternativ valenţa fierului din componenta prostetică, conform reacţiei:

$$Fe^{2+} \underset{+1e^-}{\overset{-1e^-}{\rightleftharpoons}} Fe^{3+}$$

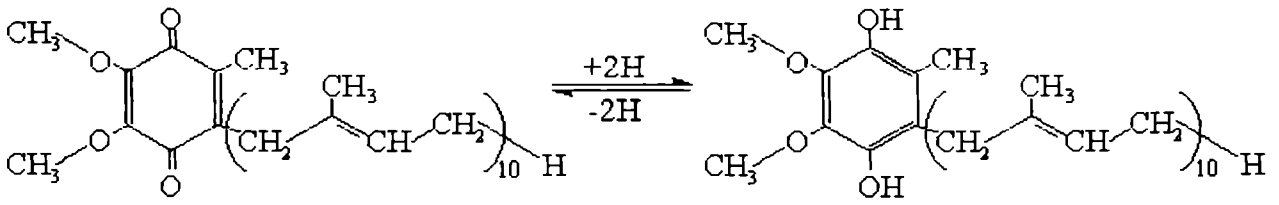
Situaţia este total diferită faţă de a hemoglobinei şi mioglobinei, care nu-şi schimbă valenţa fierului (Fe^{2+}) prin fixarea oxigenului, fapt explicabil prin diferenţele structurale atât a componentelor prostetice cât şi proteice.

Fără a intra în detalii, o prezentare schematică a fluxului de electroni (şi de hidrogen) în catena respiratorie, între coenzima Q şi oxigenul molecular, este necesară în scopul precizării locului fiecărui citocrom în etapele secvenţiale ale acestui proces, pe baza potenţialului redox:



https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Coenzima Q, numită şi ubichinonă, are oarecare asemănare cu vitaminele K, existând în forma redusă şi forma oxidată:



CoQ (forma oxidată) CoQ (forma redusă)

Ea reprezintă, de fapt, un punct inițial important în acest flux electronic mitocondrial.

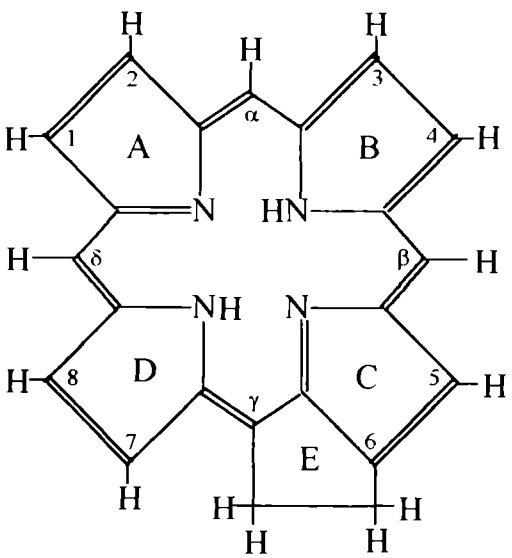
Compuşi cu structură heminică (Fe^{3+}) în partea prostetică includ peroxidaza, catalaza, methemoglobina şi clorheminele, dintre care primele două sunt tratate în capitolul de enzime.

IV.6.5.1.2. Cromoproteine porfirinice fără funcție respiratorie

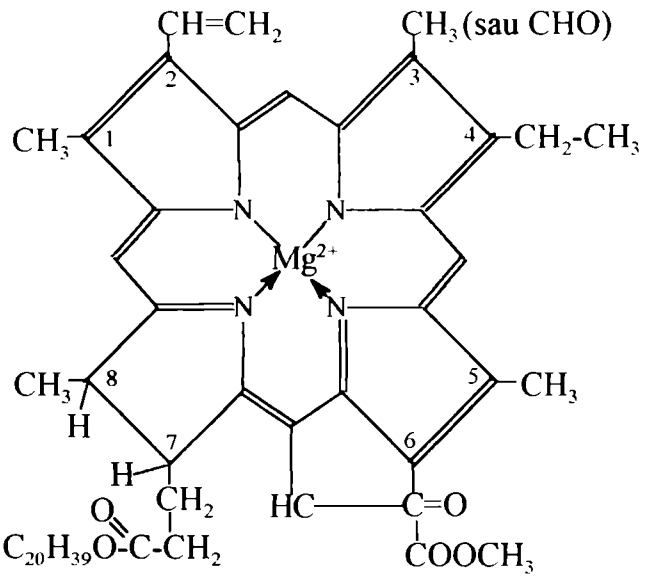
Această grupă cuprinde cloroglobinele (cloroplastinele) şi legoglobina (leghemoglobina), din regnul vegetal.

A.Cloroglobine. Cloroglobinele, numite şi cloroplastine, sunt cromoproteine porfirinice, de culoare verde, biosintetizate în celula vegetală. Sunt proteine conjugate, având ca parte proteică plastina, iar ca parte prostetică clorofila. Legătura dintre cele două părți componente este necovalentă, ceea ce explică şi separarea lor cu uşurință.

Clorofila. Denumirea de clorofilă reprezintă un termen colectiv, dat unui complex de pigmenți izolați din frunzele verzi. Toate clorofilele derivă de la un monociclu de bază numit forbină, având substituenții şi alte caracteristici structurale bine precizate.



Forbina



Clorofila a (C_3-CH_3)
Clorofila b (C_3-CHO)

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În partea centrală a macrociclului forbinei, clorofilele de orice tip conțin ionul de magneziu tetracoordinat la atomii N din ciclurile pirolice ABCD, astfel că molecula clorofilelor se aseamănă în multe aspecte structurale cu hemul din hemoglobină, mioglobină și citocromi.

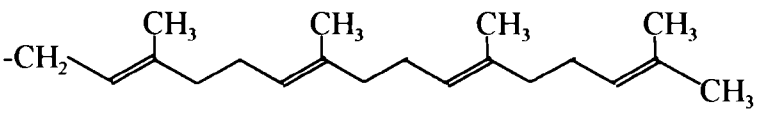
În afară de clorofilele a și b întâlnite în plantele verzi, au fost identificate și izolate din alge, clorofilele c_1, c_2 și d, iar din unele bacterii, bacterioclorofilele a și b (tabelul IV.14).

Tabelul IV.14 – Clorofile din alge și unele bacterii

Denumire	Substituenți la:					
	C_2	C_3	C_4	C_7	Alte detalii structurale	Planta de origine
Clorofila c_1	$-CH=CH_2$	$-CH_3$	$-CH_2-CH_3$	A	$>C_7=C_8<$	-Alge brune -Alge galben-brune
Clorofila c_2	$-CH=CH_2$	$-CH_3$	$-CH=CH_2$	A	$>C_7=C_8<$	-Alge brune -Alge galben-brune
Clorofila d	$-CHO$	$-CH_3$	$-CH_2-CH_3$	B	$>C_7H-C_8H<$	Alge roșii
Bacterioclorofila a	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$	$-CH_3$	$-CH_2-CH_3$	B și G	$>C_7H-C_8H<$ $>C_3H-C_4H<$	
Bacterioclorofila b	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$	$-CH_3$	$=CH-CH_3$	B	$>C_7H-C_8H<$ $>C_3H-C_4H<$	

unde: A= $-CH=CH-COOH$

B= $-CH_2-CH_2-COOC_{20}H_{39}$

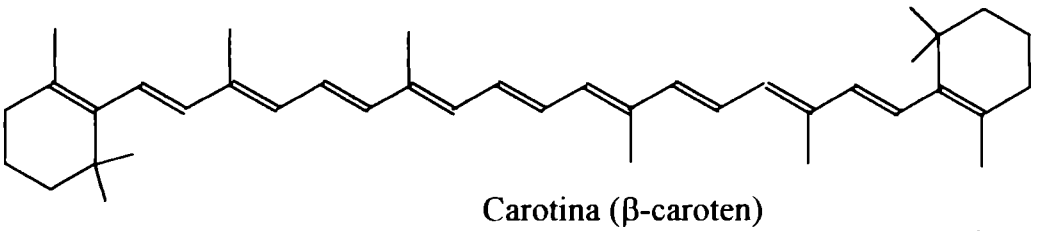
G= 

Geranilgeranil

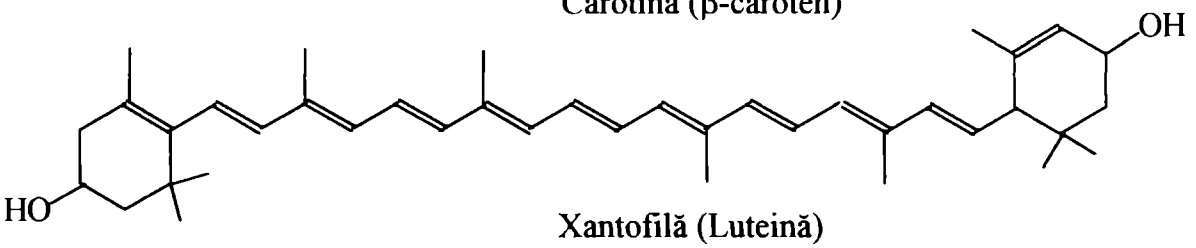
Clorofilele a și b se găsesc în plantele superioare, fiind pigmentul frunzelor verzi. Clorofila a are o culoare albastră-verzuie, iar clorofila b – verde închis.

În frunze, clorofilele a și b se află în raport 3:2, fiind însoțite de două substanțe de natură carotinoidică (carotina și xantofila), împreună cu care joacă un rol primordial în procesul de fotosinteză.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Carotina (β-caroten)



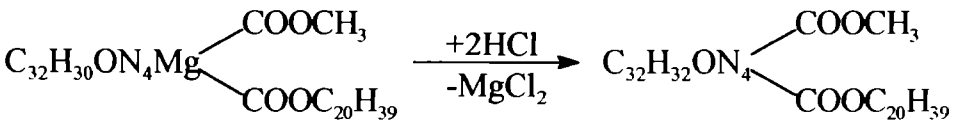
Xantofilă (Luteină)

Proprietăți fizice şi chimice. Clorofilele sunt substanțe solide, solubile în eter, acetonă, metanol şi etanol.

În soluții alcoolice, clorofilele au o culoare verde-albastră şi o fluorescență roşie-rubinie.

În prezența apei, clorofila dizolvată în solvenți organici devine coloidală, iar fluorescența roşie de la λ_{max}=680nm dispare.

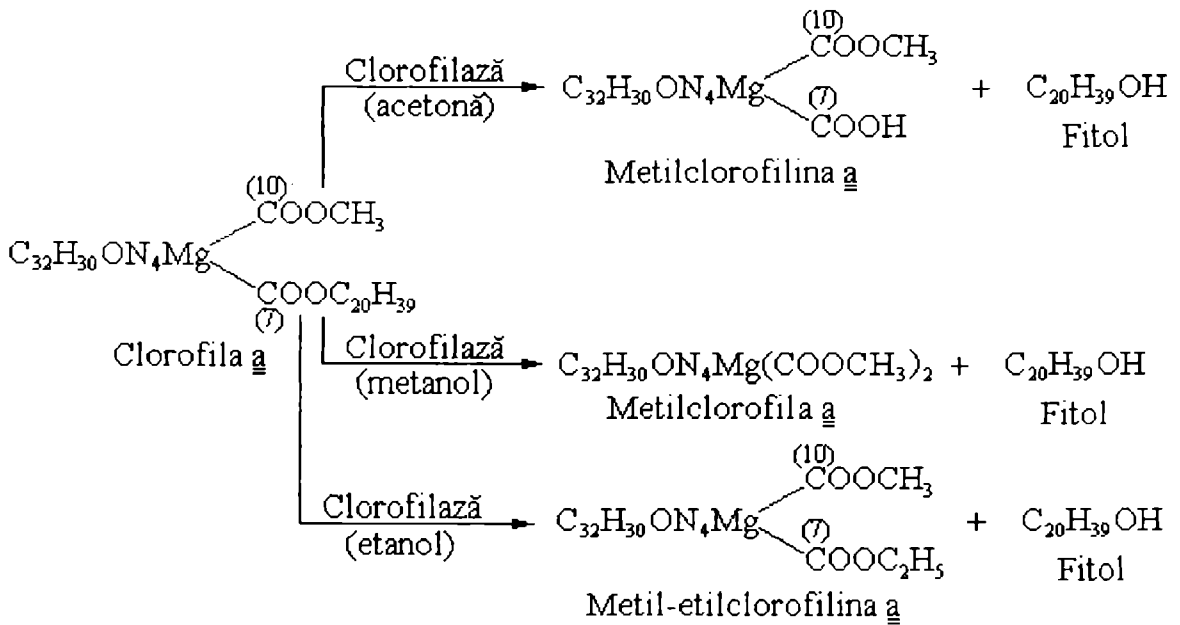
Sub acțiunea acizilor (de exemplu, HCl diluat) asupra clorofilelor se elimină Mg^{2+}, fiind înlocuit de doi atomi de H, obținându-se feofitinele a şi b, de culoare brună:



Clorofila a Feofitina a

Prin reintroducerea ionului Mg^{2+} în molecula feofitinelor, se obțin clorofilele inițiale.

Interesantă este acțiunea enzimei clorofilaza asupra clorofilelor (şi derivaților lor), în diverse madii ca: acetonă, metanol şi etanol:



https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Acțiunea clorofilazei transferă hidrolitic grupa ester din poziția 7, eliberând fitolul şi metilclorofilina (în cazul prezentat). În mediul metanolic sau etanolic are loc (global) o transesterificare, în cursul căreia restul fitolului este înlocuit prin metil, respectiv etil.

Hidrogenarea clorofilelor în condiții energice (cu H_2 activ pe paladiu) duce la compuşi incolori, numiți porfirinogeni, iar vitamina C produce clorofile reduse la nivelul ciclului E. Tot la nivelul ciclului E, clorofila în soluție alcoolică se autooxidează, formând produşi oxidați de culoare verde, printre care şi oxiclorofile (C_{10}-OH).

Rol biologic. După cum s-a menționat deja, clorofilele a şi b, însoțite de carotină şi xantofilă, joacă un rol deosebit de important în procesul fundamental din natură, fotosinteza.

Sub acțiunea luminii, clorofila a absoarbe specific radiații de anumite lungimi de undă. La rândul său şi clorofila b absoarbe selectiv radiații de alte lungimi de undă, specifice, emițând apoi prin fluorescență radiații cu lungimi de undă caracteristice absorbției de către clorofila a. În mod similar şi ceilalți pigmenți din celulă transmit energia absorbită de ei clorofilei a, lărgind astfel regiunea spectrală efectivă. Clorofila a transmite mai departe energia înmagazinată în cursul acestui proces sistemului chimic, pentru fotosinteză.

Utilizări. Prin extracție din frunzele verzi, cu acetonă apoasă, urmată de separare prin metoda absorbției (pe talc), clorofila obținută poate fi utilizată ca pigment natural în alimentație, în cosmetică, industrie şi ca prooxidant în autooxidarea lipidelor.

Printre altele, preparatele de clorofilă mai pot fi utilizate ca antiseptice, în gume de mestecat, pastă de dinți, unguente etc.

B.Legoglobina (Lb) se mai numeşte şi leghemoglobină şi este o cromoproteină porfirinică de culoare roşie, care se găseşte pe nodozitățile de pe rădăcinile plantelor leguminoase. Denumirea este un termen colectiv, fapt dovedit cromatografic, prin separarea legoglobinelor a, b, c şi d. Masele lor moleculare variază pe domeniul 15,4KDa (Lba)-16,8KDa (Lbb şi Lbc), preponderente fiind primele două dintre ele.

Leghemoglobina este singura cromoproteină heminică din regnul vegetal şi poate fi obținută foarte uşor prin extracție cu apă din nodulii de pe rădăcinile de soia, urmată de precipitare cu sulfat de amoniu.

Grupa prostetică este protoporfirinică, cu structuri de hem asemănătoare hemoglobinei şi mioglobinei. Are atomul de fier central autooxidabil. Componenta proteică este constituită dintr-un lanț format din aproximativ 140 resturi de aminoacizi, sărac în His şi lipsit de aminoacizi cu sulf (Cys şi Met). Au fost semnalate asemănări structurale între fracțiunea Lba din legoglobină şi lanțul γ din hemoglobina umană, fapt care sugerează similitudini ale codului genetic.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

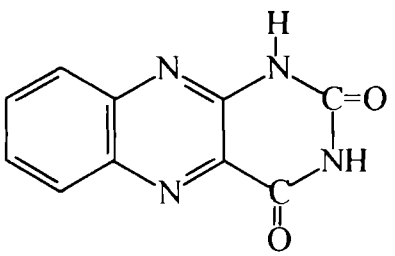
Rolul biologic al leghemoglobinelor nu este bine elucidat. Unele păreri avansate anterior, potrivit cărora leghemoglobinele formează un complex reversibil cu N_2 sau că joacă rol de sistem redox între bacterii şi N_2, precum şi rolul posibil de transportor de O_2 în bacterii (sau în celulele radiculare), au fost pe rând infirmate. Ce s-a constatat cu certitudine este faptul că în timpul fixării N_2, nivelul leghemoglobinei din nodulii rădăcinilor creşte şi că nitrogenaza necesită ATP. Se crede astfel că leghemoglobina facilitează difuziunea O_2, stimulează fosforilarea oxidativă şi accentuează producerea ATP, crescând gradul de fixare a N_2.

Sinteza leghemoglobinei se produce numai în plantele leguminoase (zona radiculară) şi bacteriile din genul Rhizobium, cu care se află în simbioză. Aproximativ 70-80% din partea prostetică se biosintetizează în bacteriile simbionte din nodozităţile radiculare şi numai 20-30% în rădăcina plantei, în timp ce partea proteică se biosintetizează în întregime în rădăcină.

Informaţia genetică necesară biosintezei leghemoglobinei din nodulii radiculari vine de la plantă, însă leghemoglobina nu poate fi produsă în absenţa bacteriilor. Plantele leguminoase care nu au bacterii de acest gen nu pot fixa azotul, acţiunea de cooperare între planta gazdă şi bacteriile din nodozităţile radiculare fiind nulă. Problema devine interesantă şi în contextul înţelegerii aspectelor biochimice ale simbiozei.

IV.6.5.1.3. Cromoproteine neporfirinice cu funcţie respiratorie

Cele mai importante cromoproteine din această categorie sunt flavoproteinele, un grup de proteine conjugate, în care grupa prostetică este un compus cu nucleu aloxazinic sau izoaloxazinic.



Aloxazina ; Izoaloxazina

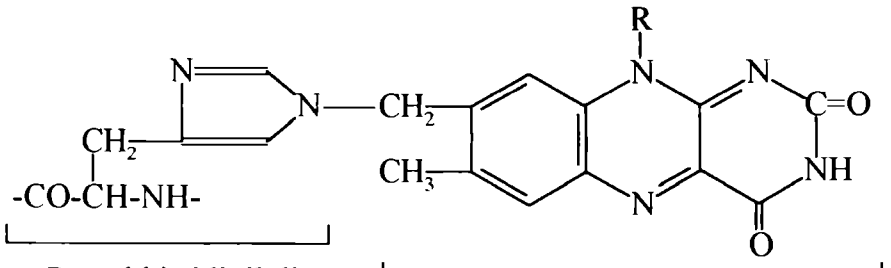
Dintre compuşii flavinici, o deosebită importanţă prezintă riboflavina (vitamina B_2), care face parte din grupa prostetică a flavinenzimelor, respectiv FMN (flavin-mononucleotida) şi FAD (flavin-adenin dinucleotida).

În cele mai multe flavin-enzime, legătura între componenta prostetica şi cea proteică este necovalentă. Cu toate acestea, legătura este destul de trainică şi funcţionează mai degrabă ca pentru o grupă prostetică decât pentru o coenzimă. Atât în timpul desfăşurării actului catalitic cât şi după terminarea lui, flavinnucleotida nu părăseşte enzima.

Disocierea flavonucleotidei de partea proteică poate avea loc numai în medii cu tărie ionică mare sau cu pH mic.

Sunt şi unele flavin enzime, ca de exemplu succinat dehidrogenaza, în care flavin nucleotida FAD este legată covalent de un rest de aminoacid (histidinil) din proteină:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Restul histidinil din lanțul proteic

FAD

Flavin enzimele sunt oxidoreductaze care participă la multe transformări metabolice la nivel celular.

Structura FMN şi FAD, mecanismul reacţiilor la care aceste nucleotide iau parte şi alte aspecte sunt prezentate în capitolele vitamine şi enzime.

Unele enzime flavinice conţin şi metale ca fier şi molibden, componente esenţiale pentru exprimarea activităţii catalitice specifice.

În funcţie de capacitatea lor de a reacţiona cu acceptorii de electroni, oxidoreductazele flavinice pot fi considerate ca făcând parte din categoria dehidrogenazelor sau a oxidazelor, aşa cum se poate observa din tabelul IV.15.

Tabelul IV.15 – Flavin enzime

Tipul flavin enzimei	Masa moleculară (KDa)	Cofactorul enzimatic	Metalul adiţional
DEHIDROGENAZE			
NADH-dehidrogenaza	300	FMN	Fe
Succinat dehidrogenaza	100	FAD	Fe
Dihidrolipoil dehidrogenaza		FAD	--
Acil-CoA dehidrogenaza		FAD	--
Flavoproteinele transportoare de electroni		FAD	--
Glicerol-3-fosfat dehidrogenaza		FAD	Fe
OXIDAZE			
D-Aminoacid oxidaza	100	FAD	--
Glucoz oxidaza	154	FAD	--
Xantin oxidaza	300	FAD	Fe, Mo
Aldehid oxidaza	280	FAD	Fe, Mo
Dihidroorotat oxidaza	115	FMN, FAD	Fe

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

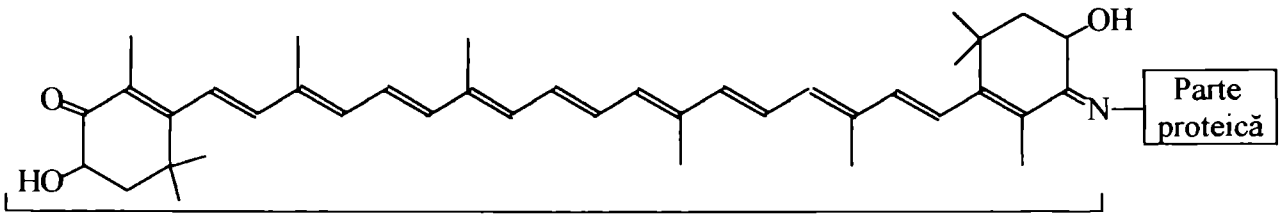
IV.6.5.1.4. Cromoproteine neporfirinice fără funcţie respiratorie

IV.6.5.1.4.1. Carotenoproteine

Carotenoproteinele sunt proteine conjugate a căror grupare prostetică este de natură carotenoidică.

Legătura dintre componenta proteică şi cea prostetică în carotenoproteine este, în general ionică, dar sunt şi situaţii când aceasta este de tip covalent. Exemple de proteine pentru acest ultim caz sunt rodopsina, un receptor retinian (vezi vitamina A), ovoverdina din tegumentele exterioare şi ouăle crustaceelor etc., conţinând legătura aldiminică (tip bază Schiff), formată între o grupă carbonilică aparţinând componentei carotenoidice şi o grupă $-NH_2$ liberă din partea proteică.

În ovoverdină, componenta proteică se leagă de astaxantină, este de culoare verde-brună sau albastră şi are următoarea structură:



Astaxantină

La fierberea în apă a racilor, schimbarea culorii de la verde închis la roşu se datorează denaturării ovoverdinei, însoţită de eliberarea grupei prostetice carotenoidice.

În ovoverdină, raportul dintre astaxantină şi proteină este de 1:142, componentele heteroproteinei putându-se separa prin încălzire moderată în absenţa aerului.

Au mai fost identificaţi complecşi cu luteina, complexul β-carotinei cu albumina etc.

Carotenoproteinele apar într-o mare varietate de culori, în diverse surse biologice: albastru-negre (în carapacea homarilor); verzi-brune (în Gamarus pulex); albastre (în Heterocope saliens); violet-roşii (în Aristeus antennatus) etc.

Referitor la rolul biologic al carotenoproteinelor se poate considera că legarea compuşilor carotenoidici de proteine reprezintă atât o formă de transport a carotenoizilor în organism cât şi ca specii active, necesare unor procese biologice (de exemplu, procesul vederii).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

V. ENZIME

Enzimele sunt proteine sintetizate de celulele vii, având funcții catalitice specifice în metabolismul celular.

Din punctul de vedere al enzimologilor, viața este o funcție armonioasă a enzimelor, pe când starea de boală a organismului se definește ca o deficiență sau o dezordine a sistemelor enzimatice.

Substanțe bioactive ca hormonii sau citokinele, precum și o mare parte a medicamentelor, acționează prin intermediul sistemelor enzimatice pe care le stimulează sau le inhibă prin diverse mecanisme.

Fiecare organism viu își biosintetizează la nivel celular echipamentul enzimatic propriu necesar metabolismului său pe tot parcursul vieții.

În organism, enzimele catalizează reacții care, în lipsa lor, ar decurge foarte lent sau la temperaturi ridicate, improprii vieții. Deși efectul acțiunii lor asupra reacțiilor metabolice este asemănător în linii mari cu cel al catalizatorilor din cataliza chimică (scăderea energiei de activare a reacțiilor), în comparație cu aceștia, enzimele prezintă unele particularități:

-sunt eficiente în cantități mult mai mici decât catalizatorii chimici;

-deși participă la reacții, enzimele se regenerează în întregime la sfârșitul lor, putând lua parte practic la un număr infinit de transformări de același fel;

-nu modifică echilibrul unor reacții reversibile, dar accelerează viteza de atingere a echilibrului;

-având structură de proteine, pot fi denaturate de agenți care le alterează conformația (temperaturi mai mari de 35-40^{o}C; pH < 4,5-4 și pH > 9-9,5; solvenți organici; metale grele; radiații UV; detergenți și alți agenți chimici de denaturare etc);

-o proprietate deosebită a reacțiilor enzimatice "in vivo" (din celulele vii) este susceptibilitatea acestora față de o reglare biologică, putându-se crește sau micșora activitatea enzimatică în funcție de necesitățile organismului;

-datorită structurii lor de proteine, enzimele au o înaltă specificitate de substrat și de reacție. La nivelul celulei vii acționează peste 2000 de enzime, fiecare dintre ele fiind specifică unui anumit substrat și unei anumite reacții a acestuia.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

V.1. Nomenclatură

Conform recomandării Comisiei pentru Enzime (Enzyme Commission) a Uniunii Internaționale de Biochimie, s-au stabilit mai multe criterii pentru denumirea enzimelor:

1)Enzimele se împart în 6 clase, după specificitatea de reacție: oxidoreductaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze, ligaze (sintetaze).

2)Numele unei enzime se compune din trei părți: prima parte indică substratul (substratele) asupra cărora acționează enzima; a doua parte indică tipul de reacție catalizată; la sfârşit se adaugă sufixul "ază".

3) În paranteză se pot da informații suplimentare privind reacția catalizată.

4) Fiecare enzimă primeşte un număr de cod, format din patru cifre: prima cifră indică tipul de reacție (clasa de enzime); următoarele două cifre specifică eventuala subclasă, iar a patra cifră indică sub-subclasa (enzima individuală).

Numărul de cod este precedat de inițialele EC (Enzyme Commission).

În afară de acest mod de stabilire a nomenclaturii enzimelor, în multe cazuri se utilizează denumirile uzuale ("triviale") ale acestora.

De exemplu, lactat dehidrogenaza (denumire uzuală) are codul EC 1.1.1.27.

Prima cifră (1) desemnează clasa oxidoreductazelor; următoarele două cifre (1.1) arată că enzima face parte din subclasa celor care acționează într-un sistem redox, în care donorul de hidrogen (sau electroni) este un alcool, acceptorul fiind NAD^+ sau $NADP^+$. Enzima este a 27^a clasificată (ultimul număr) în subsubclasa 1.1.1.

În tabelul V.1 sunt date şi alte exemple care ilustrează sistemul de codificare a nomenclaturii enzimatice:

Tabelul V.1 – Clasificarea şi nomenclatura unor enzime

Clasa	Reacții catalizate	Exemple de subclase	Exemplu ilustrat cu:	
			Denumirea științifică	Denumirea uzuală
1.Oxidoreductaze	Oxidarea unui substrat (S) concomitent cu reducerea altuia (S'); S redus +S' oxidat→S'redus+Soxidat	1-1 Acționând asupra grupării -CH-OH (OH)	EC 1.1.1.1. Alcool-NAD oxidoreductază	Alcool dehidrogenază
2.Transferaze	Transferul unei grupări G de pe un substrat pe altul $S_1G+S_2 \rightarrow S_1+S_2G$	2-7 Transfer de grupări fosfat (fosfotransferaze)	EC 2.7.1.1. ATP-D-hexozo-6-fosfotransferază	Hexokinază
3.Hidrolaze	Hidroliza legăturilor eter, ester, peptidil, glicozil etc.	3-1 Acționând asupra legăturii ester	EC 3.1.1.8. Acilcolin-acilhidrolază	Colinesterază
4.Liaze	Îndepărtează grupări de pe substrat lăsând în loc duble legături	4-2 Carbonoxigenliază	EC 4.2.1.2. L-malat-hidroliază	Fumarază

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabelul V.1 (continuare)

Clasa	Rcacții catalizatc	Exemple de subclase	Exemplu ilustrat cu:	
			Denumirea științifică	Denumirea uzuală
5.Izomeraze	Interconversia izomerilor	5-3 Interconversia aldozelor şi cetozelor	EC 5.3.1.1. D-glicerol-aldehid-3-fosfat-ketolizomerază	Triozofosfat izomerază
6.Ligaze	Formarea legăturilor C-O, C-N, C-S în reacții cuplate cu degradare de ATP	6-3 Formarea legăturii C-N	EC 6.3.1.2. L-glutamat-amoniuligază	Glutaminsintetază

Deşi denumirile uzuale sunt folosite des în practica curentă, acestea nu sunt destul de sistematice, pe când nomenclatura sistematică permite identificarea exactă a unei enzime.

V.2. Structura enzimelor. Mecanismul reacțiilor enzimatice

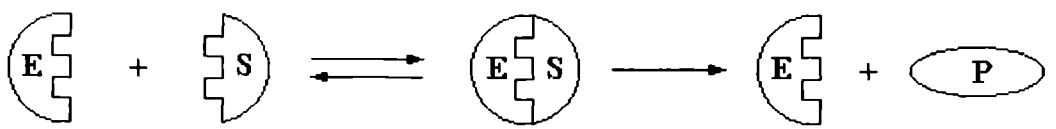
Deoarece fac parte din clasa proteinelor, enzimele se clasifică în:

-holoproteine formate numai din catene polipeptidice (proteine simple) şi

-heteroproteine sau proteide (proteine conjugate) formate din două componente: o proteină şi o grupă prostetică (substanță neproteică), care poate fi o coenzimă legată covalent sau necovalent de partea proteică sau alte grupe prostetice ca: vitamine hidrosolubile, nucleotide, ioni metalici etc.

Partea proteică se numeşte apoenzimă şi poate fi formată din una sau mai multe catene polipeptidice.

V.2.1. Situsul (centrul) catalitic al enzimei este definit, într-o accepțiune mai veche, ca fiind o microincintă în structura conformațională a proteinei, conținând un număr mic de resturi de α-aminoacizi dispuşi într-un aranjament strict determinat, complementar steric structurii substratului, ca lacătul cu cheia sa:



, în care:

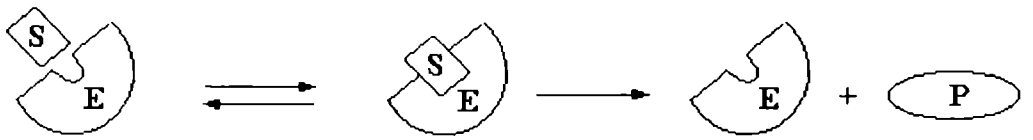
E = enzimă;

S = substrat;

P = produs de reacție.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

La ora actuală, această ipoteză a unui tipar rigid tip lacăt-cheie este considerată ca fiind depăşită. Există dovezi conform cărora zona activă a enzimei este dotată cu o oarecare plasticitate, astfel încât substratul ("formator") poate induce modificări sterice ale enzimei, care devine mai receptivă, ajungând să fie complementară steric substratului:



Zonele alosterice de pe apoenzimă sunt regiuni (altele decât situsul catalitic), care pot fixa molecule mici, diferite de cele ale substratului (inhibitori, activatori, produşi de reacţie etc.); acest fenomen determină o reglare a activităţii enzimei, modificând afinitatea sa faţă de substratul specific.

Modificări importante de temperatură, pH, tărie ionică etc. pot duce la alterarea (denaturarea) structurii enzimei, cu pierderea activităţii sale biocatalitice.

V.2.2. Stabilitatea complexului enzimă - substrat

Interacţiile moleculare substrat-enzimă din sistemele biologice sunt reversibile şi se reduc practic la posibilitatea formării de legături necovalente (electrostatice, legături de hidrogen, legături van der Waals etc.), care guvernează aceste interacţii. Specificitatea de substrat a enzimei este datorată preponderent părţii proteice (apoenzima).

Dacă enzima este formată numai din resturi de α-aminoacizi, aminoacizii din situsul (centrul activ) catalitic vor fi dispuşi altfel decât în restul catenei polipeptidice, dar grupaţi în spaţiu pe o arie cu un diametru de 1-3nm. Dacă enzima este o heteroproteină (metalo-enzime, NAD- şi FAD-enzime etc.), grupa prostetică este plasată în centrul catalitic activ.

Denaturarea enzimei este consecinţa modificării configuraţiei centrului activ, ca rezultat al modificării structurilor secundară, terţiară şi cuaternară ale apoenzimei. Denaturarea poate fi reversibilă (când structura centrului activ se poate reface prin îndepărtarea agentului de denaturare) sau ireversibilă.

În multe cazuri substratul specific joacă un rol protector pentru enzimă, conservând structura centrului activ al acesteia.

Între substrat şi centrul activ al enzimei se pot forma următoarele tipuri de legături:

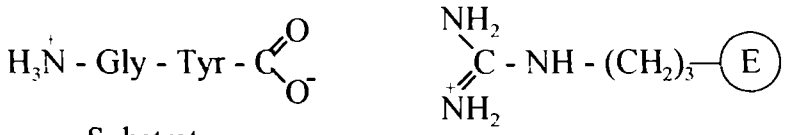
A. Interacţii electrostatice

O grupă ionizată din molecula substratului poate interacţiona cu o grupă de semn contrar de pe situsul activ al enzimei. Asemenea legături se formează la pH fiziologic, când resturile polare de Lys, Arg, Glu şi Asp sunt ionizate.

Un exemplu este legătura care se formează între glicil-L-tirosină şi carboxipeptidaza A (enzimă proteolitică, cu proprietatea de a scinda resturile de acizi C-terminali din peptide).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Astfel, grupa carboxilat electronegativă de pe substratul dipeptidic interacționează cu grupa guanidiniu (electropozitivă) din restul de arginină al enzimei, distanța dintre cele două grupe fiind de 0,28nm:

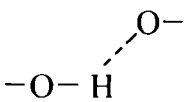


Substrat

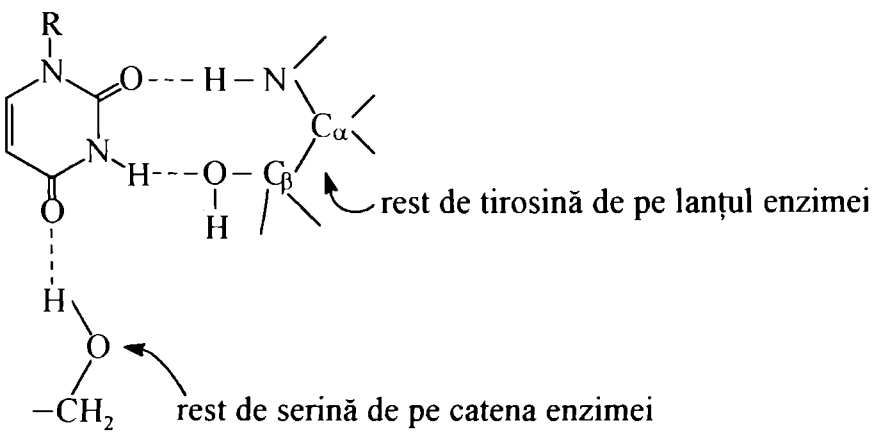
B.Legături de hidrogen (cu energia de formare de 3-10 kcal/mol) se observă în cazul majorității substratelor neutre, care se pot lega de enzime cu afinitate şi specificitate ridicată.

Asemenea legături apar între două grupe funcționale, dintre care una este donoare şi cealaltă – acceptoare de hidrogen. În sistemele biologice, donorul este un atom de oxigen sau de azot legat covalent de atomii de hidrogen, iar acceptorii pot fi de asemenea atomi de oxigen sau de azot.

Tăria legăturilor de hidrogen este cuprinsă între cea a legăturilor covalente şi a celor van de Waals, dar depinde de direcția pe care se formează. Astfel, legăturile de hidrogen cele mai puternice sunt cele în care donorul, acceptorul şi atomul de hidrogen sunt coliniari: $-O-H\cdots O-$. Dacă acceptorul formează un unghi față de dreapta care uneşte donorul şi atomul de hidrogen, legătura va fi cu atât mai slabă, cu cât unghiul format va fi mai mare:



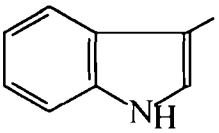
Rolul formării legăturilor de hidrogen în interacția substrat-enzimă poate fi ilustrat prin legarea porțiunii de uridină din substrat cu ribonucleaza pancreatică, o enzimă care scindează ARN:



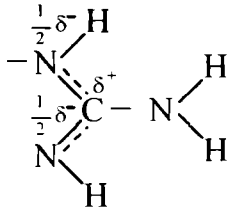
Varietatea legăturilor de hidrogen este destul de mare, deoarece 11 din cele 20 de resturi de aminoacizi naturali din lanțul polipeptidic al enzimei pot forma legături de hidrogen; esențial este ca aceştia să fie disponibili pentru aceasta. Astfel:

-resturile de Trp şi Arg pot servi numai ca donori în formarea legăturilor de hidrogen:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Donor



Donor

-resturile de Asn, Glu, Ser şi Thr pot avea atât rol de acceptor cât şi de donor;

-capacitatea de a forma legături de hidrogen a Lys (şi a grupelor COOH terminale), Tyr şi His variază cu pH-ul; în funcție de intervalul de pH, aceştia pot funcționa fie ca donori, fie ca acceptori (dar nu în ambele roluri simultan).

C.Legături van der Waals

Acestea sunt rezultatul unor forțe de atracție nespecifice între doi atomi situați la distanța de 0,3-0,4nm. Legăturile van der Waals sunt mai slabe şi mai puțin specifice decât legăturile de hidrogen şi cele ionice, dar la fel de importante din punct de vedere biologic. Energia de formare a legăturilor van der Waals este <2kcal/mol.

Tăria acestor legături depinde de distanța dintre atomii implicați. Deşi energia de formare a legăturii dintre o pereche de atomi este de aprox. 1kcal/mol, o asemenea interacție slabă devine semnificativă dacă între substrat şi enzimă intervine un număr mare de legături van der Waals.

Interacții van der Waals între substrat şi enzimă pot apărea doar dacă acestea sunt complementare steric. Specificitatea legăturilor van der Waals creşte când există oportunitatea formării simultane a unui număr mare de asemenea interacții.

D.Legături coordinative apar în cazul metalo-enzimelor, prin punerea în comun a electronilor neparticipanți ai atomilor de oxigen şi azot. Aceste legături au o energie de legătură apropiată celei a legăturii covalente.

E.Interacții cu transfer de sarcină

La formarea acestor interacții participă resturile donoare de electroni π din α-aminoacizii cu caracter aromatic (Phe, Tyr şi Trp) ca şi legăturile $\rangle C = O$ din grupele amidice ale lanțurilor polipeptidice.

F.Interacții hidrofobe

În general, asemenea interacții apar la introducerea în apă a unei substanțe nemiscibile cu aceasta, când se formează o emulsie, ca rezultat al asocierii moleculelor nemiscibile cu apa, care vor forma în stratul apos o cavitate, prin deplasarea moleculelor de apă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În mod similar, apar interacţii între resturile de α-aminoacizi alifatici sau aromatici din situsul activ al enzimei şi substratele hidrofobe (lipide, steroizi etc.).

Elucidarea structurii centrului activ al enzimei se face prin tratarea acesteia cu reactivi de grup, care interacţionează cu anumite grupe din molecula enzimei. Dacă după reacţie activitatea enzimei scade, înseamnă că grupele respective sunt situate în centrul activ.

În afara legăturilor necovalente trecute în revistă anterior, între enzimă şi substrat se pot forma şi legături covalente. Rezultă complexe termodinamic stabile, uşor de izolat sau instabile, care se pot stabiliza prin modificarea chimică a enzimei.

Astfel, cvasi-substratele sunt molecule înrudite structural cu substratele specifice, care pot forma complexe covalente de tip enzimă-substrat mai stabile decât complexul format cu substratul specific.

V.2.3. Rolul apei în sistemele biologice .

Apa este un participant efectiv în formarea legăturilor de hidrogen, van der Waals şi ionice dintre enzimă şi substrat. Din acest punct de vedere sunt importante două dintre proprietăţile apei:

A.Polaritatea moleculei de apă

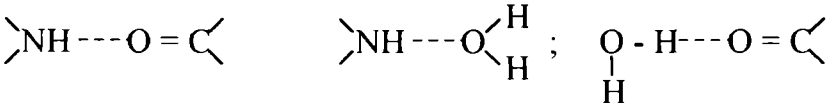
Datorită hibridizării sp^2, rezultă o structură unghiulară a moleculei de apă, cu o distribuţie nesimetrică a sarcinilor electrice. Atomul de oxigen fiind atrăgător de electroni, în jurul atomilor de hidrogen se va forma o regiune electropozitivă, iar în jurul atomului de oxigen – una electronegativă.

B.Afinitatea dintre moleculele de apă

Moleculele de apă se asociază prin legături de hidrogen, ca rezultat al polarităţii lor. În fază lichidă, fiecare moleculă de apă este legată prin legături de hidrogen cu alte 3, 4 molecule, rezultând o structură tridimensională, parţial ordonată.

Deoarece are o disponibilitate ridicată pentru formarea de legături de hidrogen şi ionice cu alte molecule, apa este un competitor efectiv în aceste tipuri de interacţii.

De exemplu, într-un mediu nepolar, legăturile de hidrogen formate între grupele amidice sunt mai puternice decât în prezenţa apei, ale cărei molecule pot înlocui parţial atât acceptorul (grupa $\rangle C = O$) cât şi donorul (grupa $\rangle NH$):



(în mediu nepolar) (în apă)

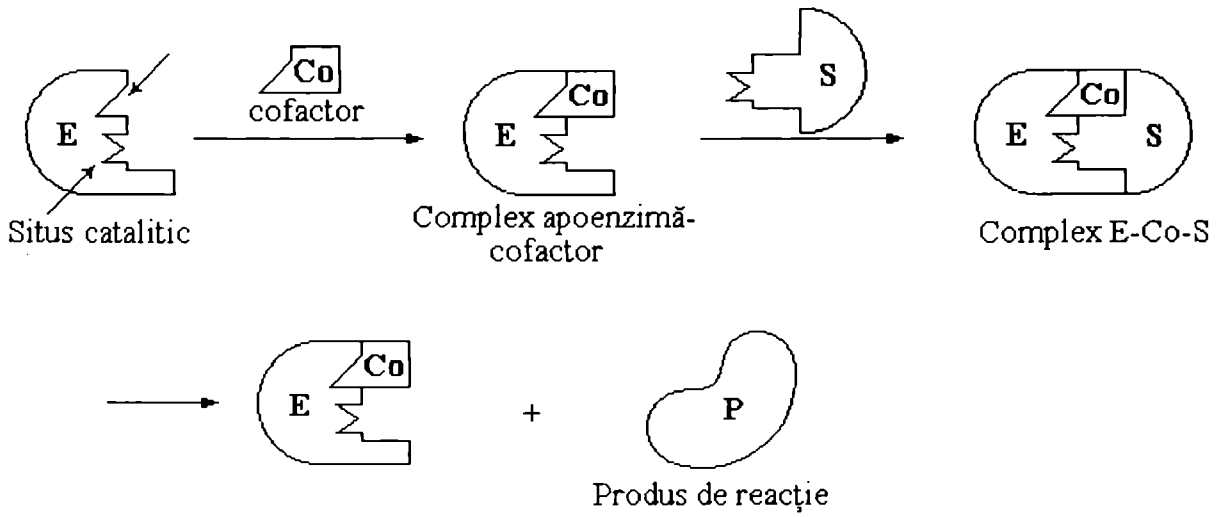
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Constanta dielectrică a apei fiind D=80, apa va diminua şi tăria legăturilor electrostatice cu acelaşi factor (80), în comparaţie cu legăturile similare formate în vid. Aceasta se explică prin polaritatea ridicată a moleculei de apă, care determină capacitatea sa de a solvata ionii, atenuând intercaţiile electrostatice dintre aceştia.

V.2.4. Coenzimele

Un număr important de enzime (din clasele: 1, 2, 4, 6 – tabelul V.1) sunt active doar în prezenţa unor coenzime (cofactori), care joacă rolul cocatalizatorilor din cataliza chimică şi fără de care reacţiile ar necesita energii înalte de activare, greu accesibile şi improprii menţinerii vieţii.

Coenzimele participă la reacţii biocatalitice, regenerându-se în întregime la sfârşitul lor:



în care: **Co** = coenzima.

Coenzimele sunt substanţe neproteice (vitamine hidrosolubile, derivaţi ai hemului, nucleotide, ioni metalici etc.) care participă la formarea complexului E–Co–S, regenerându-se la sfârşitul reacţiei.

Coenzimele au rolul de a mări activitatea biocatalitică a enzimelor, legându-se de situsul lor specific prin legături necovalente sau, uneori, covalente. În majoritatea cazurilor, activitatea coenzimelor este unică şi apare numai dacă sunt legate de moleculele enzimelor. Neavând structura de proteine, coenzimele nu au specificitate de substrat.

După modul în care pot fi regenerate la sfârşitul reacţiei enzimatice, coenzimele se clasifică în două categorii:

A.Coenzimele catalitice nu pun probleme de regenerare. Din această categorie fac parte ionii metalici mono- şi bivalenţi (Me^{+}, Me^{2+}), dar şi coenzimele incluse în însăşi structura enzimei de tip heteroproteinic, în calitate de grupă prostetică, legată covalent de apoenzimă.

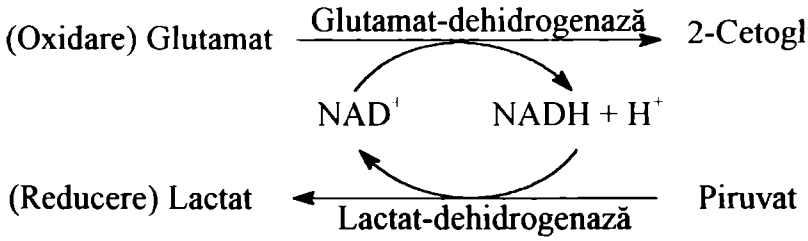
Astfel, FAD face parte din molecula glucozoxidazei sau succinatdehidrogenazei (vezi V.3.1.3.), în care este legată covalent.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

B.Coenzimele stoechiometrice

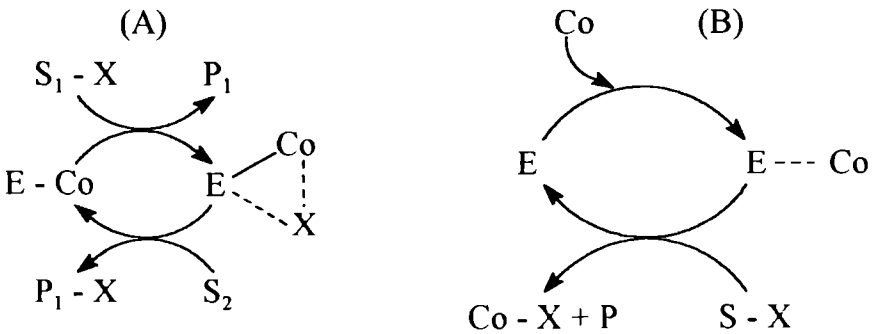
Din această categorie fac parte majoritatea coenzimelor, care necesită pentru regenerare prezența unui al doilea substrat şi a unei a doua enzime. În lipsa acestora, coenzimele stoechiometrice, uşor difuzibile, se pot pierde din sistem.

Astfel, coenzimele de tip NAD şi NADP (atât formele oxidate cât şi cele reduse) se pot regenera prin introducerea în mediul de reacție al unui al doilea sistem substrat-enzimă:



Coenzimele stoechiometrice, cu excepția acidului tetrahidrofolic, sunt în general nucleotide (NAD, NADH, NADP, NADPH, ATP, ADP, AMP, CoA).

În figura V.1 sunt schematizate modurile de acțiune a coenzimelor catalitice (A) şi stoichiometrice (B).



E=enzimă
Co=coenzimă
S, S_1, S_2=substrate
P, P_1, P_2=produşi de reacție
X=grupă transferată

Figura V.1 – Modul de acțiune a coenzimelor

Din această figură, se poate rezuma rolul general al cofactorilor şi anume acela de transportori de hidrogen sau de grupe funcționale.

V.2.5. Inhibitorii enzimatici

Inhibitorii sunt efectori care, introduşi în amestecul de reacție, provoacă în general scăderea vitezei reacției enzimatice. Efectul inhibitorilor enzimatici este foarte important în reglarea funcțiilor organismului ca şi pentru înțelegerea mecanismului de acțiune a unor medicamente.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

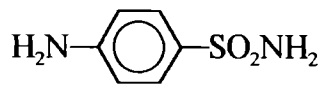
O clasificare a inhibitorilor după mecanismul de acțiune cuprinde două grupe: inhibitori competitivi şi inhibitori necompetitivi.

Un alt mod de clasificare este după locul de acțiune, când se disting: inhibitori care acționează asupra centrului activ al enzimei şi inhibitori alosterici, care pot influența reacția enzimatică acționând într-o altă zonă a moleculei enzimei.

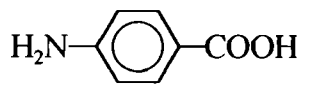
V.2.5.1. Inhibitorii competitivi: au o structură chimică asemănătoare substratului, concurând cu acesta în ocuparea centrului activ al enzimei. În consecință, se formează complexe enzimă-inhibitor (EI) în dauna complexelor ES, ceea ce duce la creşterea K_M şi la scăderea activității enzimatice. Acest efect poate fi contracarat prin creşterea concentrației substratului specific S, când se amplifică şansele formării complexului ES în defavoarea complexului EI.

Prezența unui inhibitor competitiv se exprimă cantitativ prin creşterea valorii K_M.

Astfel de inhibitori sunt foarte frecvent întâlniți. De exemplu, sulfamidele de tip:



sunt analogi chimici ai acidului p-aminobenzoic (PAB):



şi inhibă sistemele enzimatice ale microbilor care consumă PAB.

V.2.5.2. Inhibitorii necompetitivi: nu posedă o structură asemănătoare substratului şi efectul lor nu poate fi concurat prin creşterea concentrației acestuia. În consecință, valoarea K_M nu este influențată, în timp ce viteza maximă (V_{max}) a reacției enzimatice este mult diminuată.

Inhibitorii necompetitivi se pot desprinde de pe enzimă (inhibitori reversibili), iar alții (inhibitori ireversibili) nu pot fi îndepărtați şi sunt adevărate "otrăvuri" ale enzimelor. Din această ultimă categorie fac parte: iodacetamida, ioni ai metalelor grele (Ag^+, Hg^{2+}), unii agenți oxidanți etc.

Aspirina este un inhibitor necompetitiv ireversibil al ciclooxigenazei din plăcuțele sanguine.

V.2.5.3. Inhibitorii alosterici: care se fixează în altă zonă decât situsul catalitic al enzimei (situs alosteric), produc modificări conformaționale "la distanță" ale situsului catalitic, reducând afinitatea enzimei pentru substrat (fig.V.2).

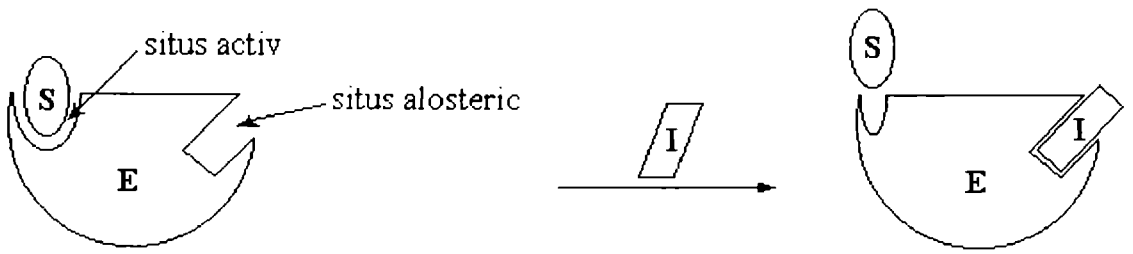


Fig.V.2 – Modul de acțiune a unui inhibitor alosteric

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Există şi cazuri în care modificatori ai situsului alosteric pot duce nu la inhibarea, ci la activarea enzimei, crescându-i afinitatea faţă de substrat. De exemplu, citratul care inhibă alosteric fosfofructokinza, limitând procesul de glicoliză, activează prin acelaşi mecanism alosteric acetil-CoA carboxilaza, stimulând biosinteza de acizi graşi.

De aceea, este mai corect ca în loc de "inhibitori alosterici" să se utilizeze termenul mai cuprinzător de "efectori alosterici".

V.2.6. Factori care influenţează cinetica reacţiilor enzimatice

Cel mai simplu sistem enzimatic reactional cu un singur substrat poate fi reprezentat după cum urmează:

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \rightleftharpoons EP \xrightarrow{k_3} E + P$$, în care:

k_1, k_2 şi k_3 reprezintă constantele de viteză pentru diferitele etape ale reacţiei.

Principalii factori care influenţează viteza unei reacţii enzimatice sunt: concentraţia enzimei, pH-ul mediului de reacţie, temperatura, concentraţia substratului şi timpul de contact dintre enzimă şi substrat. Alături de aceşti factori, mai pot interveni: tăria ionică a mediului de reacţie şi concentraţia inhibitorilor.

V.2.6.1. Influenţa concentraţiei enzimei

Viteza unei reacţii enzimatice (V) se exprimă prin cantitatea de substrat (S) transformată în unitatea de timp (t):

$$V = -\frac{dS}{dt}$$

La o concentraţie constantă de substrat, viteza reacţiilor enzimatice creşte proporţional cu concentraţiei enzimei, până la o limită peste care se produc abateri de la proporţionalitate (fig.V.3):

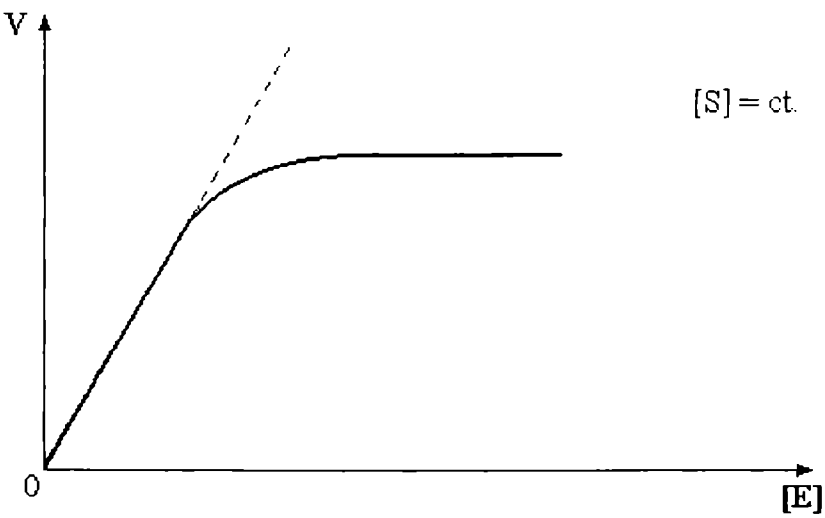


Fig.V.3 – Influenţa concentraţiei enzimei asupra vitezei de reacţie enzimatică

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

V.2.6.2. Influența pH-ului

Efectele induse de variațiile de pH asupra vitezei unei reacții enzimatice se datorează modificării stării de ionizare a moleculei enzimei, ceea ce influențează capacitatea de fixare a substratului la situsul biocatalitic.

În acest caz, variația vitezei de reacție cu pH-ul (fig.V.4) prezintă o valoare optimă caracteristică pentru fiecare enzimă (pH optim), la care activitatea enzimatică este maximă. Maximul poate fi mai larg (ca la fosfataza acidă) sau mai îngust (ca la fosfataza alcalină).

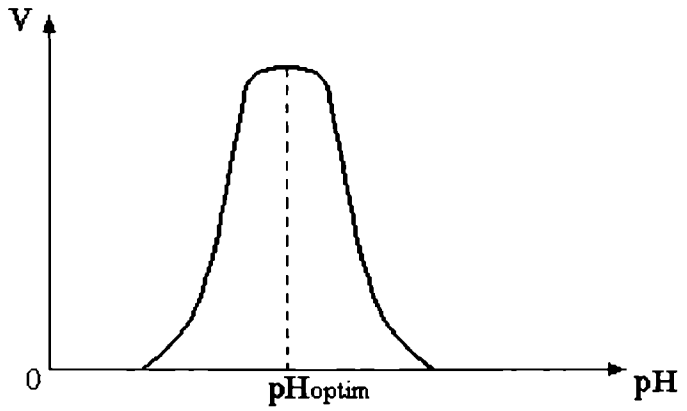


Fig.V.4 – Influența pHului asupra vitezei reacției enzimatice

Valori extreme ale pH-ului pot denatura enzima, dezactivând-o.

În cazul unor reacții reversibile, pH-ul optim poate diferi în funcție de sensul reacției (cazul lactat-dehidrogenazei).

Valoarea pH-ului optim al unei enzime se asigură cu ajutorul soluțiilor tampon. În alegerea tamponului se ia în considerare şi aciditatea produşilor de reacție. Astfel, produşii de reacție pot fi acizi (în cazul fosfatazelor sau al lipazei) sau alcalini (în cazul ureazei). Este necesar să se utilizeze tampoane suficient de concentrate (în general 0,15M) şi de puternice (o unitate de pH în jurul valorii pK a sistemului).

Şi temperatura poate modifica concentrația ionilor de H^+ şi deci pH-ul mediului de reacție. Practic, pH-ul sistemelor tampon trebuie determinat la aceiaşi temperatură, la care are loc şi reacția enzimatică.

Aceiaşi enzimă poate prezenta diferite valori ale pH-ului optim de reacție, în funcție de substratul asupra căruia acționează. Astfel, papaina are un pHoptim=1,8 în reacția cu caseina, în timp ce în reacția cu hemoglobina are pHoptim=2,2.

Sursa din care se izolează enzima poate influența la rândul său pH-ul optim. De exemplu, α-amilaza din malț hidrolizează amidonul la un pHoptim=5,2, în timp ce α-amilaza din salivă are în aceiaşi reacție un pHoptim=6,8.

Majoritatea enzimelor se denaturează ireversibil la valori extreme de pH (pH<4 şi pH>9,5).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

V.2.6.3. Influența temperaturii

Ca urmare a creşterii temperaturii, într-o reacție enzimatică se pot produce două fenomene antagonice (fig.V.5):

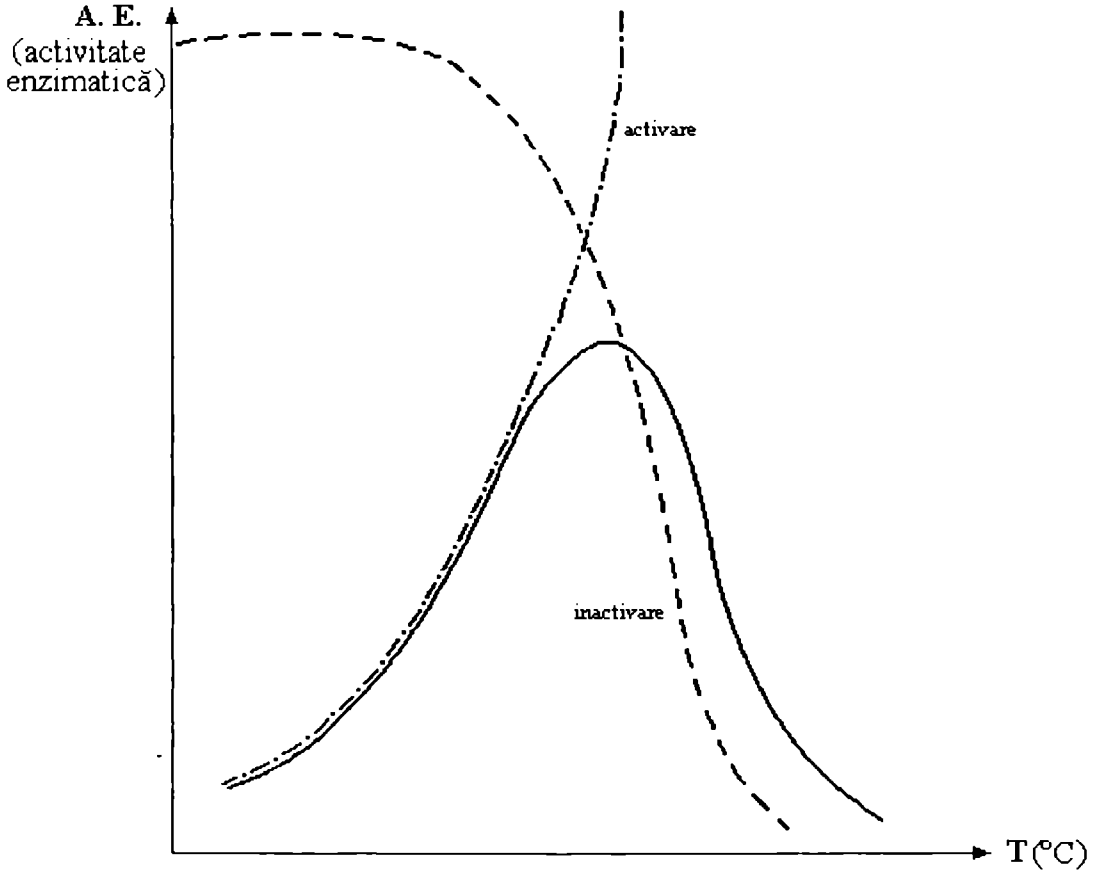


Fig.V.5 – Efectul temperaturii asupra activității enzimatice

Viteza unei reacții chimice creşte cu temperatura. Astfel, o creştere cu 10°C aproape dublează viteza de reacție. Dacă temperatura creşte, enzimele pot fi însă denaturate termic. În fig.V.5, curba plină este o rezultantă a acestor două fenomene. Deci este vital ca în cursul reacției enzimatice temperatura să fie strict controlată.

De obicei se aplica termostatarea, pentru că o variație de 0,10°C poate provoca o eroare de 1%. Temperatura la care debutează inactivarea termică este variabilă, în funcție de enzimă. Majoritatea enzimelor se denaturează la temperaturi de peste 55-60°C. Unele enzime (termofile) rămân active şi peste 85°C (în apele termale).

În general, temperatura optimă a activității enzimatice este cuprinsă între +35°C şi +40°C.

V.2.6.4. Durata contactului dintre enzimă şi substrat

Durata unei reacții enzimatice evoluează în funcție de tipul acesteia. Din fig.V.6 se observă că $\frac{dP}{dt}$ la origine (care corespunde unei viteze inițiale), este mare şi că scade până la anulare când echilibrul de reacție este atins.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

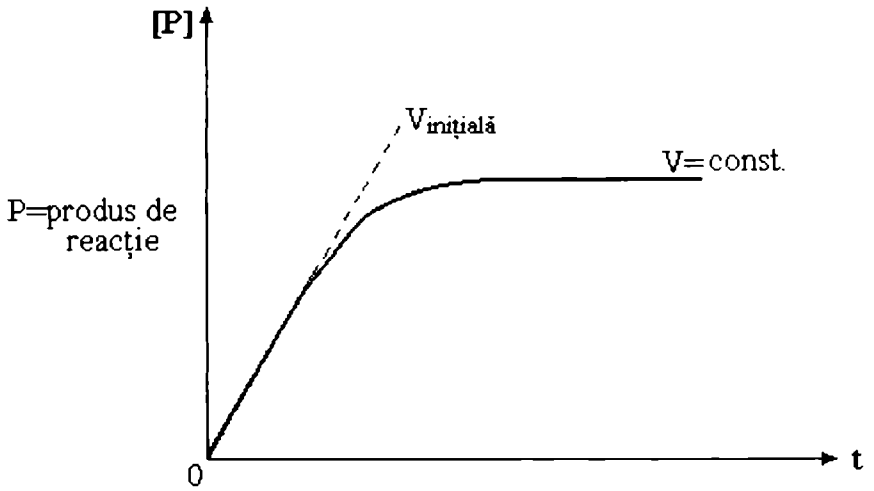


Fig.V.6 – Evoluția vitezei unei reacții enzimatice cu timpul

În acest fenomen intervin mai mulți factori, printre care: scăderea concentrației substratului, creşterea concentrației produsului de reacție, denaturarea enzimei etc. De aceea, este preferabil să se mărească viteza de reacție înainte ca aceşti factori să intervină.

Viteza inițială reprezintă cea mai bună estimare a activității enzimatice. Practic, măsurarea se poate realiza după o incubare de câteva minute a enzimei cu substratul.

V.2.6.5. Influența substratului

Natura substratului modifică afinitatea şi deci valoarea constantei K_M a enzimei.

În general, pentru estimarea activității enzimatice se aleg substrate pentru care valoarea K_M să fie cea mai mică, iar vitezele de reacție măsurate să fie cele mai rapide.

Concentrația substratului este un alt parametru care influențează viteza unei reacții enzimatice. Pentru un sistem bine definit în: enzimă, pH, temperatură, tărie ionică şi concentrații variabile de substrat, se constată că viteza de reacție creşte cu concentrația substratului, tinzând către o valoare maximă (V_{max}). Aceasta înseamnă că pentru concentrații foarte mari de substrat, viteza de reacție devine independentă de acestea (fig.V.7).

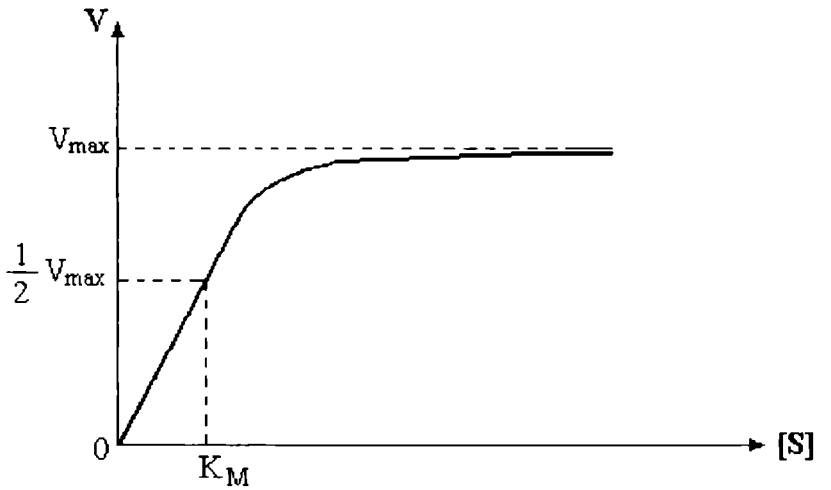


Fig.V.7 – Evoluția vitezei unei reacții enzimatice în funcție de concentrația substratului

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Viteza de reacție se exprimă prin relația:

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \qquad \text{(ecuația Michaelis – Menten)}$$

în care K_M = constanta Michaelis – Menten.

Această relație a fost dedusă considerând ecuația de mai sus a unei reacții cu un singur substrat, pentru care:

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

În cazul particular în care viteza de reacție este jumătate din viteza maximă ($V = \frac{V_{max}}{2}$), din ecuația Michaelis – Menten se obține:

$$\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}; \qquad \frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_M + [S]}; \qquad 2[S] = K_M + [S] \qquad \text{şi } K_M = [S].$$

Deci, constanta Michaelis – Menten se poate defini ca o concentrație a substratului pentru care viteza reacției enzimatice este jumătate din valoarea vitezei maxime. În acest caz (al reacției enzimatice cu un singur substrat) constanta K_M este independentă de concentrația enzimei şi se exprimă în moli/l.

K_M, caracteristică pentru fiecare enzimă în parte, este o măsură a afinității enzimei pentru substratul său specific şi este invers proprțională cu afinitatea enzimei fața de substrat:

$$K_M = \frac{1}{\text{afinitate}}$$

O modificare a ecuației Michaelis – Menten constă în exprimarea parametrilor V şi [S] prin valorile lor reciproce (1/V şi 1/[S]). Se ajunge astfel la ecuația:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M + [S]}{V_{max} \cdot [S]} \quad \text{sau} \quad \frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{[S]}{V_{max} \cdot [S]},$$

care prin simplificare devine:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad \text{(ecuația Lineweaver-Burk).}$$

Avându-se în vedere că doar V şi [S] sunt variabile, în timp ce K_M şi V_{max} sunt constante pentru fiecare pereche enzimă-substrat, ecuația Lineweaver-Burk este de tipul: y=ax+b, care conduce la aşa-numita reprezentare grafică dublu reciprocă (fig.V.8):

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

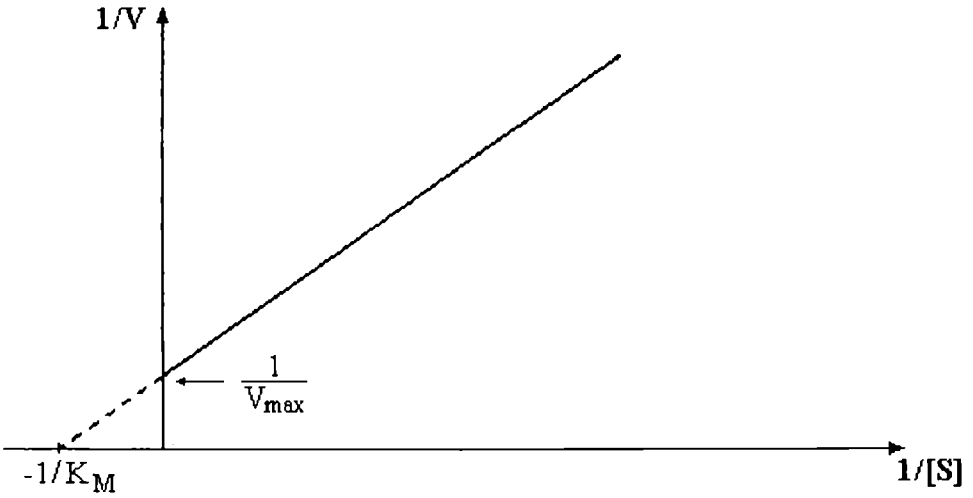


Fig.V.8 – Reprezentarea dublu reciprocă a ecuației Lineweaver-Burk

Cu ajutorul acestei relații se efectuează doar 4-5 determinări de activități enzimatice, la concentrații diferite de substrat şi se poate calcula constanta Michaelis–Menten (K_M).

V.2.6.6. Alți factori care pot influența activitatea unei enzime

Printre aceşti factori se poate menționa tăria ionică a mediului de reacție şi natura tamponului, care pot deplasa echilibrul reacției. Este cazul aminoalcoolilor, capabili să capteze ionii fosfat produşi în reacția catalizată de fosfataza alcalină. Utilizarea unui tampon cu acțiune transfosforilantă permite o multiplicare a vitezei de reacție cu un factor care poate ajunge până la 4.

Echilibrul reacției enzimatice mai poate fi deplasat şi prin cuplarea cu o reacție în care se consumă unul dintre produşii de reacție.

Activatorii sunt susceptibili de a creşte viteza de reacție. Asemenea activatori sunt coenzimele adăugate în exces. De exemplu, ionii bivalenți sunt activatori: Mg^{2+} pentru kinaze, Zn^{2+} pentru fosfataza alcalină, Mn^{2+} pentru peptidaze; de asemenea, ionii Mg^{2+} şi K^+ sunt activatori pentru piruvat-kinază, iar anionul Cl^- – pentru α-amilaza pancreatică. Totuşi, concentrația lor trebuie ajustată cu grijă, căci excesul acestor ioni poate inhiba enzimele.

Destul de frecvent, prezența grupelor SH este necesară activității biocatalitice.

Metalele grele sunt inhibitori enzimatici. Pentru a se evita acțiunea lor, în unele determinări este recomandabilă adăugarea unor mici cantități de agenți complexanți (EDTA) sau de reactivatori ai grupelor SH.

Unii produşi de reacție (de exemplu, ionul fosfat pentru fosfataze) sunt inhibitori, ceea ce impune eliminarea lor din mediu. Unii coagulanți (ca ionul F^-) pot stânjeni reacția enzimatică.

Detergenții utilizați pentru spălarea sticlăriei sunt în mod frecvent inhibitori. Reactivi ca soluțiile de NADH (H^+) şi NADPH (H^+) pot da naştere prin descompunere la produşi cu acțiune inhibitoare; asemenea reactivi se folosesc numai în soluții prospăt preparate.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

V.2.7. Unităţi de activitate enzimatică

Estimarea activităţii enzimatice (a capacităţii de a cataliza o anumită reacţie) este utilizată la dozarea enzimelor.

Cum, în condiţii optimizate, viteza unei reacţii enzimatice este proporţională cu cantitatea de enzimă din mediul de reacţie, exprimarea activităţii unei enzime se face pe baza vitezei reacţiei catalizate (cantitatea de substrat convertită în unitatea de timp).

A)Conform Uniunii Internaţionale de Biochimie, o unitate enzimatică (U) catalizează conversia unui μmol de substrat în decurs de un minut, în condiţiile standard recomandate.

În laboratoarele biochimice se obişnuieşte raportarea activităţii enzimatice la 1l sau la 1ml ser sau plasmă; exprimarea se poate face fie sub formă de U/l, fie sub formă de mU/ml, valorile fiind identice numeric.

B)Activitatea specifică reprezintă numărul de unităţi enzimatice raportat la un miligram de proteino-enzimă.

C)Activitatea molară (moleculară) este numărul moleculelor de substrat transformate într-un minut de o singură moleculă de enzimă în condiţii optimizate (de pH, temperatură şi concentraţie a substratului).

D)Noţiunea relativ recentă de "Katal", reprezintă activitatea enzimatică capabilă de a transforma un mol de substrat în decurs de o secundă (Kat=mol/sec). Pentru a evita utilizarea numerelor subunitare se recurge la subunităţi de Katal şi anume: μKat şi nKat.

Transformarea din U/l în Kat/l se face împărţind U/l la 60 (1 minut=60 sec.). De exemplu, o activitate a aspartat-aminotransferazei de 16U/l devine 0,266μKat/l sau 266nKat/l. Acest mod de exprimare, nefiind încă unanim acceptat, în majoritatea publicaţiilor de specialitate rezultatele sunt prezentate sub formă de U/l.

În lipsa unor reactivi standard optimizaţi este însă dificil să se vorbească de valori general-valabile, deoarece mici modificări de lucru în tehnica de laborator pot conduce la variaţii mari ale valorilor activităţilor enzimatice. De exemplu, valorile normale pentru lactat dehidrogenază (LDH) determinate la 25°C oscilează în limitele 120-240U/l, în timp ce la 37 °C, aceste valori se situează în domeniul 260-500U/l.

V.2.8. Izoenzime

Izoenzimele sunt forme moleculare multiple ale aceleiaşi enzime, distincte din punct de vedere fizic şi având în general aceiaşi activitate catalitică. Având mase moleculare apropiate cu cele ale enzimelor, se poate spune că este vorba de un caz de poliformism molecular.

Izoenzimele se găsesc în aceiaşi specie, organ sau celulă. Biosinteza lor este determinată de gene diferite, ceea ce explică deosebirile din compoziţia lor în aminoacizi (structură primară) şi în conformaţie (structură terţiară). Aceste deosebiri conduc la o diferenţiere a unor proprietăţi ca: mobilitatea electroforetică, punctul izoelectric, cinetica reacţională, tipuri de inhibiţie, comportarea lor la separări cromatografice, termostabilitatea etc.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Izoenzimele pot fi separate pe baza unor astfel de diferenţieri fizice.

În măsura în care izoenzimele diferă antigenic, se pot separa şi prin metode imunologice.

Din punct de vedere structural, izoenzimele sunt proteine oligomere, alcătuite dintr-un număr relativ mic de protomeri. Astfel, lactat dehidrogenaza (LDH) prezintă cinci enzime diferite, NAD-dependente, fiecare dintre ele având capacitatea de a cataliza reacţia de transformare a L-lactatului în piruvat.

Aceste izoenzime au fost izolate pe baza diferenţei de mobilitate electroforetică la pH=8,8, pe acetat de celuloză. Din fig.V.9 se poate observa că LDH_1 din muşchiul cardiac este cea mai rapidă, iar LDH_5 musculară – cea mai lentă.

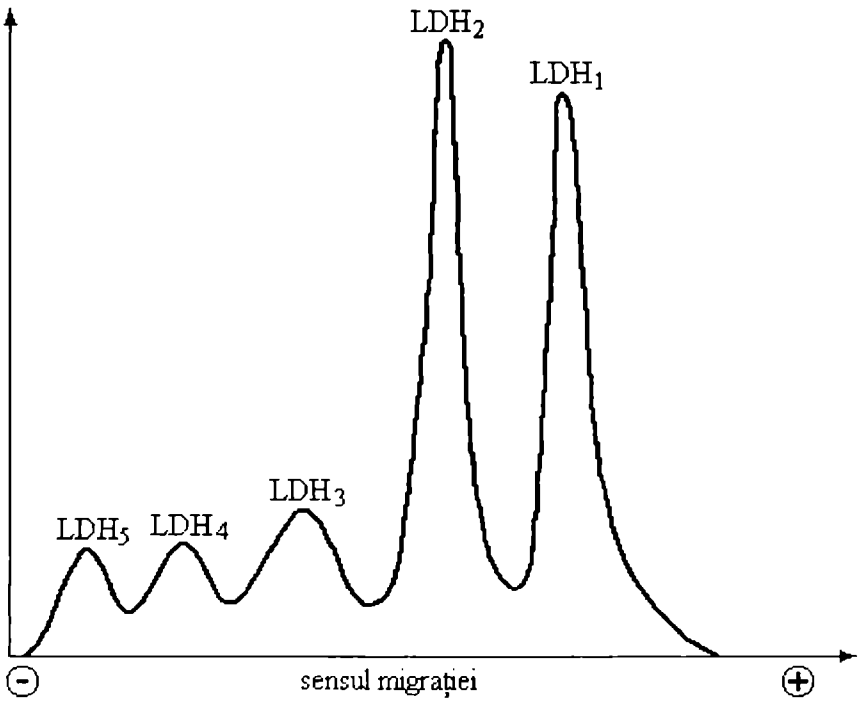


Fig.V.9 – Diagrama electroforetică a LDH serice

Fiecare dintre cele cinci izoenzime este alcătuită din patru catene polipeptidice (protomeri, cu masa moleculară 33,5KDa), provenind de la două specii polipetidice diferite, notate cu H şi M, asociate în ordine (fig.V.10).

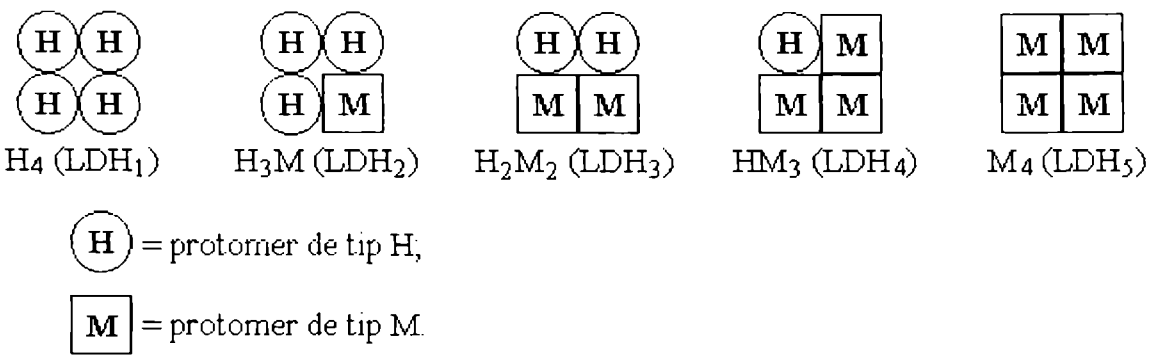


Fig.V.10 – Izoenzimele lactat dehidrogenazei

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Protomerii de tip H (de la heart=inimă) sunt de origine cardiacă, iar cei de tip M (de la muscle=muşchi), de origine musculară.

Prin combinarea tetramerică a celor două tipuri de protomeri, rezultă cinci lactat dehidrogenaze, ca în fig.V.10. Izoenzima LDH_1 predomină în ţesuturi cu profil metabolic oxidativ (creier, inimă, rinichi), în timp ce izoenzima LDH_5 predomină în ţesuturi cu metabolism glicolitic accentuat (muşchi scheletic).

Toate cele cinci izoenzime reduc acelaşi substrat, L-piruvatul la L-lactat, însă cu viteze diferite: LDH_1 cu viteza cea mai mare, LDH_5 cu viteza cea mai mică, iar LDH_2, LDH_3 şi LDH_4 cu viteze intermediare, în funcţie de raportul dintre protomeri şi caracteristicile lor cinetice.

Identificarea, separarea şi dozarea izoenzimelor sunt utilizate în biochimia clinică pentru diagnosticarea afecţiunilor inimii şi ficatului.

Un alt exemplu de diferenţiere de izoenzime importante pentru diagnosticul de laborator este cel al creatinkinazei (CK sau CPK). Această enzimă este alcătuită din două subunităţi: B (din creier) şi M (din musculatură). Izoenzima CK-BB se află în creier; izoenzima CK-MM – în musculatura striată şi în miocard, iar izoenzima CK-MB este specifică doar miocardului, având o valoare deosebită în diagnosticarea infarctului miocardic.

S-a reuşit izolarea de izoenzime şi în alte cazuri (fosfataza alcalină, fosfataza acidă, α-amilaza, colinesteraza serică etc.).

V.2.9. Sisteme enzimatice multisecvenţiale

Un sistem enzimatic multisecvenţial este definit ca un ansamblu de enzime care catalizează o reacţie multisecvenţială (în etape), fiecărei etape (secvenţe) a reacţiei principale corespunzându-i o enzimă specifică. Pentru a se evita confuziile, nu se foloseşte termenul de "complex multienzimatic", care defineşte aglomerările naturale de enzime din celule.

Într-o reacţie enzimatică multisecvenţială, produsul unei secvenţe reacţionale devine substratul următoarei secvenţe. Între enzimele sistemului se stabileşte astfel o cooperare strictă, transformarea substratului iniţial în produsul final având loc în prezenţa tuturor acestor enzime. Dacă sistemul enzimatic este incomplet, o asemenea transformare nu poate avea loc.

Exemple de astfel de reacţii enzimatice multisecvenţiale sunt procesele metabolice complete, care se petrec în prezenţa enzimelor asociate, mai mult sau mai puţin agregate, sau legate de o membrană. Astfel, s-a demonstrat că după centrifugarea extractelor de celule de Euglema, practic toate enzimele s-au găsit în diverse straturi de celule, de unde s-a tras concluzia că în celule enzimele nu sunt libere sau nelegate. Numărul de enzime dintr-un sistem enzimatic multisecvenţial poate varia de la două la peste douăzeci, iar reacţiile secvenţiale catalizate de acestea includ transferuri de atomi de hidrogen, molecule de apă, grupe alchil, acil, amino, fosfat, carboxil ş.a. de pe un substrat pe altul.

După gradul de complexitate, sistemele enzimatice multisecvenţiale pot fi simple (disociate) sau complexe (asociate).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

V.2.9.1. Sisteme disociate

În acest caz, enzimele se găsesc dispersate în citoplasmă, ca molecule individuale, iar substratul (caracterizat prin dimensiuni mici şi o mare mobilitate) difuzează prin mediul celular, întâlnind enzimele care-l transformă în cadrul unei suite de reacţii consecutive de forma:

$$S \xrightarrow{E_1} P_1 \xrightarrow{E_2} P_2 \xrightarrow{E_3} P_3 \dashrightarrow P,$$

unde S şi P reprezintă substratul şi, respectiv, produsul final al reacţiei multisecvenţiale; P_1, P_2, P_3, ... sunt produşii intermediari, iar E_1, E_2, E_3 ..... – enzimele corespunzătoare.

V.2.9.2. Sisteme asociate

Aceste sisteme reprezintă o asociere strânsă de enzime, sub forma unui complex enzimatic unitar, nedisociabil, în care substratele şi produşii intermediari nu difuzează în afara asocierii.

Un asemenea complex a fost găsit în drojdia de bere, care conţine în partea centrală o proteină purtătoare de grupe acil (ACP), ce asociază 6 enzime, cu rol în biosinteza acizilor graşi. Biosinteza acizilor graşi catalizată de acest sistem enzimatic are ca precursori acetil-coenzima A şi malonil-coenzima A şi decurge după schema din fig.V.11.

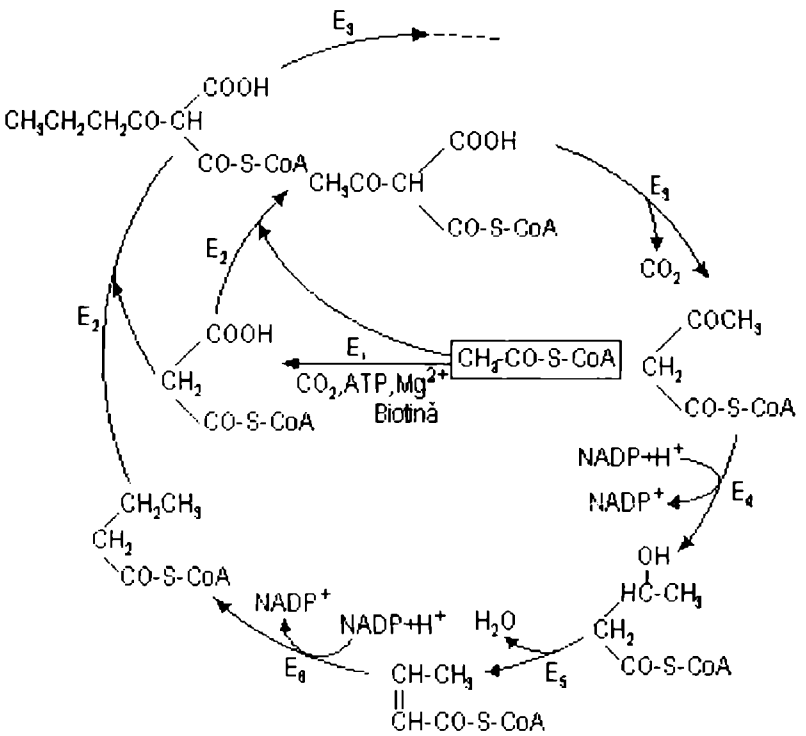


Fig.V.11 – Schema biosintezei acizilor graşi catalizată de sistemul enzimatic din drojdia de bere

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Din fig.V.11 se observă că biosinteza decurge în spirală, la sfârşitul fiecărei spire complete introducându-se în molecula acidului gras câte doi atomi de carbon. Aceasta explică predominanța naturală a acizilor graşi cu număr par de atomi de carbon.

Sisteme enzimatice multisecvențiale de o complexitate mai mare sunt asociate cu structuri supramoleculare (ribozomi, membrane etc.).

V.2.10. Reglarea activității enzimatice

Se cunosc până în prezent trei mecanisme de modulare a activității enzimelor în organism, în funcție de necesități:

-un mecanism alosteric (amintit anterior);

-un mecanism general, care constă în posibilitatea trecerii din formă inactivă de zimogen în enzimă activă;

-un mecanism dependent de capacitatea celulelor de a regla numărul moleculelor cu funcții enzimatice (prin modificarea gradului lor de inactivare sau de degradare).

V.2.10.1. Efectori alosterici

Aceşti reglatori sunt produşi ai metabolismului, în măsură să modifice afinitatea enzimelor față de substratele specifice (fig.V.2). Uneori, efectorii alosterici intervin pe mai multe căi metabolice, activând sau inhibând sistemele enzimatice.

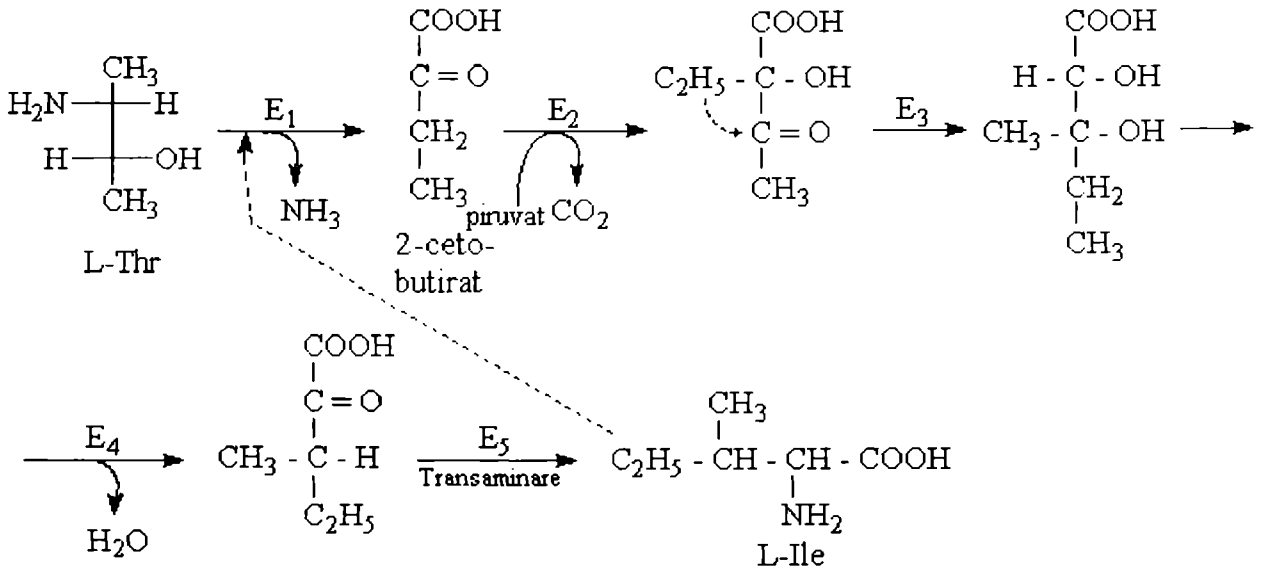
Un exemplu este cel al carenței organismului în glucide, urmată de o utilizare crescută a grăsimilor, producându-se în exces acetil-CoA. Acest metabolit este activator alosteric al piruvatcarboxilazei (enzimă cheie pe calea gluconeogenezei), având drept efect producerea de glucoză necesară sistemului nervos şi compensând parțial lipsa de glucide.

Enzimele alosterice sunt enzime inhibate de produsul final de reacție. Ele sunt prezente în multe sisteme enzimatice multisecvențiale, în care produsul final al secvențelor reacționale acționează ca inhibitor specific al uneia dintre enzime, de obicei prima din lanțul de reacții.

Acest mecanism este important pentru organism atunci când concentrația produsului final depăşeşte limitele fiziologice admise. În acest caz, produsul final intervine în reglarea întregului proces biochimic, printr-o inhibare la nivelul primei enzime. Produsul final are în acest caz rol de efector alosteric sau modulator enzimatic, fenomenul fiind cunoscut ca inhibiție prin produs final sau inhibiție prin feedback (retroinhibiție).

Un astfel de efect de inhibiție prin feedback se întâlneşte la conversia L-treoninei în L-izoleucină, proces cu cinci secvențe:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



În urma acestui proces, L-Ile (în concentrații mai mari decât normale) inhibă enzima E_1 (L-treonindezaminaza), exercitând un control asupra întregului proces enzimatic.

Enzimele alosterice sunt proteine oligomere, conținând cel puțin două situsuri în structura lor conformațională (terțiară): un situs catalitic specific substratului şi altul care fixează efectorul alosteric, după o schemă asemănătoare cu cea din fig.V.2.

V.2.10.2.Formarea de enzime active din precursori inactivi

Există în principal două mecanisme care asigură formarea de enzime active din precursori inactivi: activarea zimogenilor şi procesele de fosforilare şi de defosforilare.

1° Activarea zimogenilor are loc în două etape (fig.V.12). Astfel, sub acțiunea unei proteaze activatoare (fig.V.12, etapa A) are loc scindarea unei peptide din molecula zimogenului, "demascându-se" situsul activ al enzimei.

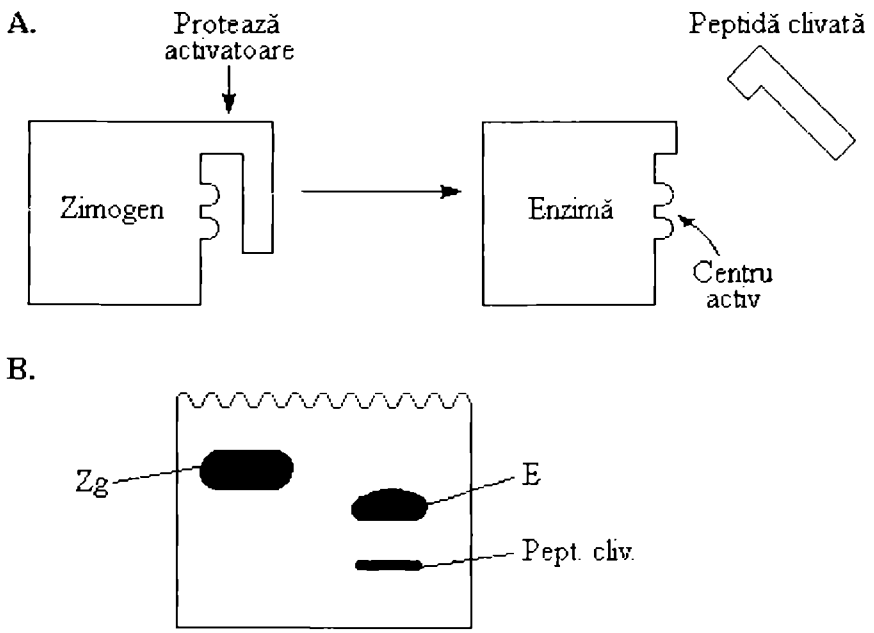


Fig.V.12 – Metode de activare a zimogenilor prin proteoliză limitată

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În cea de-a doua etapă (B din fig.V.12) se face separarea moleculelor peptidice rezultate din prima etapă prin electroforeză (în gel de poliacrilamidă activată cu dodecilsulfat de sodiu), în funcție de masa moleculară a peptidelor din amestec. Astfel, din zimogenul Zg va rezulta enzima activa (E) şi peptida de clivare (Pept. cliv.).

Proteoliza limitată intervine în cazul unor enzime proteolitice implicate în digestie şi în hemostază. Asemenea enzime sunt secretate sub formă de precursori inactivi (proenzime sau zimogeni). Prin clivare cu peptidaze, masa moleculară a zimogenului se reduce, rezultând enzime cu o masă mult mai mică. De exemplu, pepsinogenul (cu masa = 42KDa) se transformă prin proteoliză limitată în pepsină, cu masa moleculară 34,5KDa.

Iată câteva exemple de activare prin proteoliză limitată:

pepsinogen $\xrightarrow{H^+ \text{ sau pepsină}}$ pepsină

tripsinogen $\xrightarrow{\text{tripsină sau enterokinază}}$ tripsină

chimotripsinogen $\xrightarrow{\text{tripsină}}$ chimotripsină

plasminogen $\xrightarrow{\text{tripsină}}$ plasmină etc.

Uneori, activarea unor zimogeni (pepsinogen, tripsinogen) poate fi catalizată chiar de forma activă a enzimei (proces autocatalitic), viteza de reacție crescând pe măsură ce creşte numărul moleculelor de zimogen care devin enzime active.

2° Fosforilarea precursorilor inactivi

Acest proces intervine într-un mare număr de reacții enzimatice.

Un exemplu clasic este oferit de fosforilază (care inițiază glicogenoliza). Astfel, sub acțiunea unei fosforilazokinaze (o proteinkinază), forma inactivă a fosforilazei **b** trece în forma activă **a** (fosforilată) – fig.V.13 (vezi vol.II – capitolul "Hormoni").

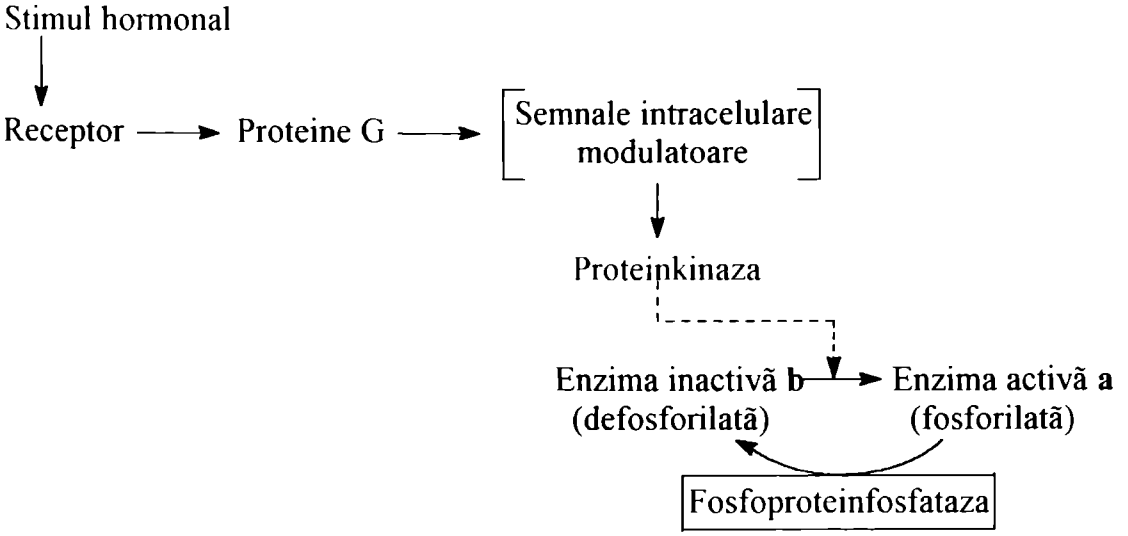


Fig.V.13 – Activarea enzimelor prin fosforilarea precursorilor inactivi

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

S-a demonstrat că între stimulul hormonal şi procesele enzimatice se interpun receptori celulari pentru hormoni, ca şi aşa-zisele proteine G (fig.V.13).

Proteinkinazele catalizează transferul de grupe fosfat pe diverse proteine (mai precis, pe resturile seril ale acestora). Activitatea proteinkinazelor este modulată prin semnale celulare de: AMP-ciclic, complexul Ca^{2+}-calmodulină, prostaglandine, ca şi de produşi rezultaţi prin scindarea enzimatică a fosfatidil-inozitolilor in membranele celulare.

V.2.11. Reglarea sintezei de enzime

Modificând numărul de molecule de enzimă implicată într-o anumită reacţie, se poate regla reacţia respectivă. Reglarea este controlată de echipamentul genetic celular şi are loc prin: inducere, represie şi derepresie.

V.2.11.1. Inducerea de enzime este o creştere adaptativă a numărului de molecule de biocatalizator prin accelerarea vitezei de sinteză sau prin reducerea vitezei de degradare a enzimei respective. Acest fenomen este declanşat de un inductor, de regulă – substratul specific al enzimei. Astfel, lactoza induce sinteza în bacterii a β-galactozidazei.

Există dovezi că inducerea de enzime joacă un rol important în metabolizarea medicamentelor, ca şi în răspunsul organismului la unele medicamente.

Unele medicamente acţionează ca inductori, producând sporirea activităţii unor sisteme enzimatice care au efect şi asupra altor metabolisme decât cele ale respectivelor medicamente. Asemenea inductori pot fi: medicamentele anticonvulsive (fenobarbital), antifungice (griseofulvină), antibiotice (rifampicina), antiinflamatorii (fenilbutazona), anticoagulante (warfarina), contraceptive (progesteron), pesticide (DDT), hidrocarburi aromatice policondensate etc. Procesul de inducere enzimatică sub acţiunea acestor agenţi are loc în ficat (în principal), dar şi în: placentă, intestin, limfocite.

Majoritatea reacţiilor enzimatice ca şi reglarea acestora are loc la nivelul celular, ceea ce stă la baza metodelor chimice de diagnosticare prin determinări de enzime în umori şi în serul bolnavilor. De exemplu, determinarea enzimelor serice serveşte la diagnosticarea unor afecţiuni ca: infarctul miocardic, boli musculatorii (dermatomiozite, hipertermia malignă etc.), hematologice (anemii megaloblastice, leucemii, limfoame etc.), boli ale oaselor (rahitism, osteoporoză, tumori etc.), carcinomul de prostată, în bolile pancreasului (carcinom pancreatic, pancreatite) şi ale ficatului (tabelul V.2).

V.2.11.2. Represia este o reducere a numărului de molecule de enzimă sub influenţa unei substanţe specifice (corepresor).

V.2.11.3. Derepresia constituie o creştere a numărului de molecule de enzimă prin scoaterea din mediu a corepresorului.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Inducerea, represia şi derepresia, descrise iniţial la microorganisme, intervin şi în reglarea metabolismelor la animale superioare. În tabelul V.2 sunt exemplificate câteva cazuri de reglare a activităţii intracelulare a unor enzime.

Tabelul V.2 – Mecanisme de reglare a activităţii intracelulare a unor enzime

Enzima	Stimul	Modificare a activităţii	Mecanism
Glucokinază	Glucoză+insulină	creşte	inducere
Fosfofructokinaza	Glucoză+insulină	creşte	inducere
	Acumulare de citrat	scade	alosterie
Glicogen sintetaza	Glucoză+insulină	creşte	inducere
	Adrenalină, glucagon, c-AMP	scade	inactivare prin fosforilare
Fosforilaza	Adrenalină, glucagon, c-AMP	creşte	activare prin fosforilare
Piruvatcarboxilaza	Glucocorticoizi	creşte	inducere
	Insulină	scade	represie
	Acetil-CoA	creşte	alosterie
Fosfoenolpiruvat carboxikinaza	Glucocorticoizi	creşte	inducere
	Insulină	scade	represie
Acetil-CoA carboxilaza	Insulină	creşte	inducere
	Citrat	creşte	alosterie
HMG-CoA reductaza	Acumulare de colesterol în celulă	scade	represie
	Depleţia de colesterol a celulei	creşte	derepresie
Diverse aminotransferaze	Glucocorticoizi	creşte	inducere
	Insulină	scade	represie
Protrombina	Factor Xa, fosfolipide, calciu, factor V	creşte (trece în trombină)	proteoliză limitată
Plasminogen	Activator tisular	creşte (trece în plasmină)	proteoliză limitată

V.3. Enzime cu specificitate de reacţie

În cele ce urmează se vor da câteva exemple de enzime pentru fiecare clasă, întrucât marea lor varietate depăşeşte cu mult limitele prezentei lucrări.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

V.3.1. Oxidoreductaze (clasa E.C.1)

Aceste enzime catalizează reacțiile de oxido-reducere prin transfer de protoni și de electroni între două substrate, sau prin combinarea substratelor cu oxigenul molecular.

În asemenea transformări apar substrate donoare (X) și acceptoare (Y), schema cea mai generală a unei reacții redox fiind următoarea:

$$X_{red} \rightleftharpoons X_{ox} + e^-$$

$$Y_{ox} + e^- \rightleftharpoons Y_{red}$$

$$X_{red} + Y_{ox} \rightleftharpoons X_{ox} + Y_{red}$$

În cazul unor asemenea transferuri de electroni între două substrate, intervin enzimele denumite generic dehidrogenaze sau reductaze.

În cazul combinării unui substrat cu oxigenul (acceptor de hidrogen), terminologia folosită pentru desemnarea enzimelor este "oxidaze".

Oxidoreductazele sunt enzime NAD^+- și $NADP^+$- dependente; coenzimele (ademinnucleotide) joacă rol de transportori de hidrogen și de electroni.

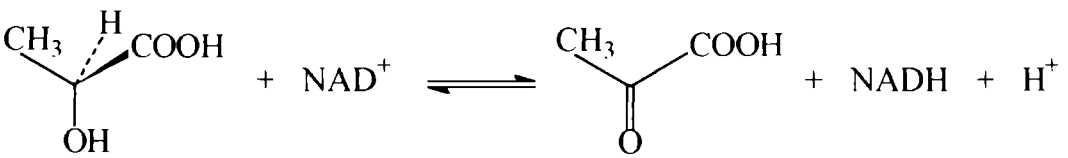
V.3.1.1. Oxidoreductaze NAD^+-dependente

A.Alcool dehidrogenaza sau alcool: NAD oxidoreductaza (E.C.1.1.1.1) catalizează reacția:

$$CH_3 - CH_2 - OH + NAD^+ \rightleftharpoons CH_3 - CHO + NADH + H^+$$

Această reacție intervine în fermentația alcoolică și prezintă interes în biochimia clinică pentru dozarea alcoolului etilic în lichide și umori biologice. Sursa principală de enzimă este drojdia de brutărie (Saccharomyces cerevisiae).

B.Lactat dehidrogenaza (LDH) sau L-lactat: NAD oxidoreductaza (E.C.1.1.1.27) catalizează reacția de oxidare a acidului L-lactic la acid piruvic:



Această reacție este implicată în fermentațiile lactice.

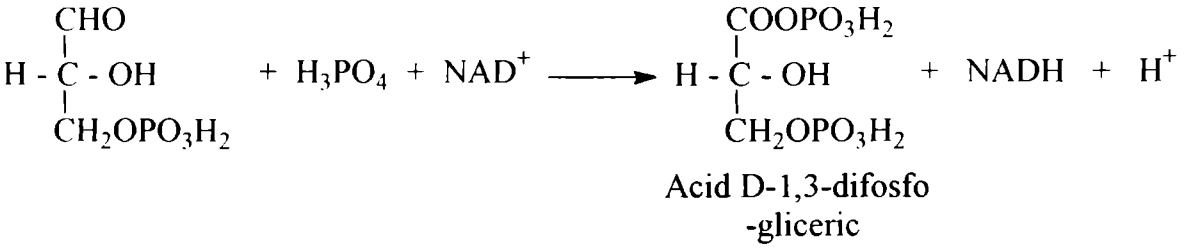
Sursele de proveniență pentru LDH sunt: musculatura, ficatul, miocardul, rinichii și eritrocitele.

Alături de alte enzime, prezența LDH în urină indică leziuni ale celulelor tubulare renale.

De exemplu, valori crescute ale LDH_1 și LDH_2 se detectează în boli renale acute și în efectul de respingere a transplantului renal. Creșteri importante în ser ale activității LDH se pot datora ischemiei acute a miocardului, unor boli musculare sau unor leziuni acute ale ficatului.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

C.D-Gliceraldehid: NAD oxidoreductaza (fosforilantă), cu codul E.C.1.2.1.12 îndeplineşte un rol important în respiraţie şi în fermentaţia alcoolică. Enzima catalizează atât oxidarea cât şi fosforilarea 3-gliceraldehid-fosfatului:



Acid D-1,3-difosfo -gliceric

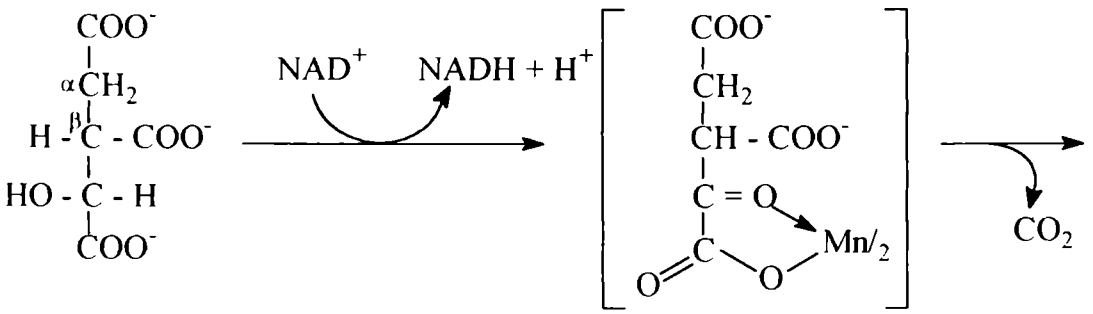
D.Izocitrat dehidrogenaza: NAD^+ dependentă catalizează decarboxilarea oxidativă a izocitratului la α-cetoglutarat (în ciclul acidului citric).

Ţesuturile mamare conţin două forme diferite ale acestei enzime:

-o formă care participă la ciclul acidului citric este localizată în întregime în mitocondrii şi utilizează NAD^+ drept cofactor;

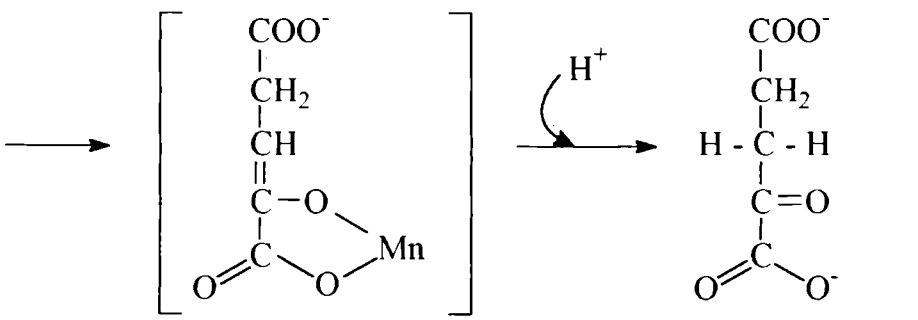
-altă formă se găseşte în mitocondrii şi în citosol şi utilizează $NADP^+$ drept cofactor.

Enzima NAD^+ dependentă (cu Mn^{2+} sau Mg^{2+} cofactori) catalizează oxidarea izocitratului în oxalosuccinat, urmată de decarboxilarea în β. Această decarboxilare are loc prin intermediul unui ion de Mn^{2+}, formându-se ca intermediar oxalosuccinat:



Izocitrat

Oxalosuccinat



α-Cetoglutarat

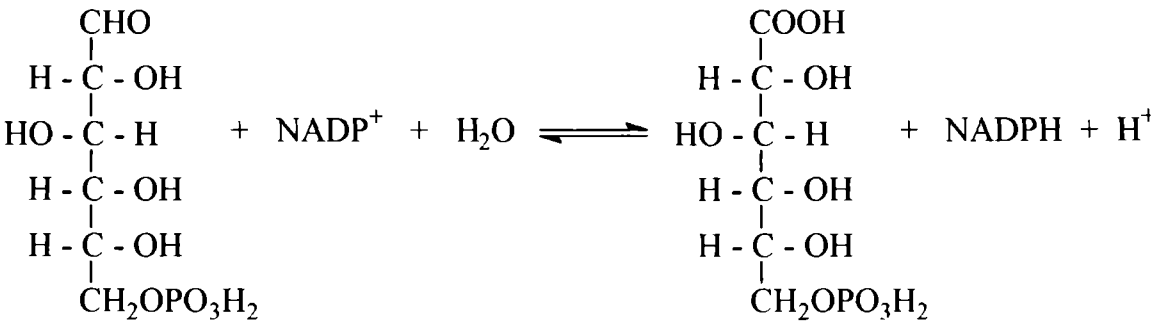
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

V.3.1.2 Oxidoreductaze $NADP^+$ dependente

În general, în această categorie intră enzimele codificate E.C.1.2.1.9 – E.C.1.2.1.12 şi E.C.1.2.1.13. Exemple din această subclasă de enzime sunt: D-gliceraldehid-3-fosfat: NADP oxidoreductaza [sau gliceraldehidfosfat dehidrogenaza (NADP)]; D-gliceraldehid-3-fosfat: NADP oxidoreductaza fosforilantă [sau gliceraldehidfosfat dehidrogenaza (NADP) fosforilantă] şi D-gliceraldehid-3-fosfat: NAD oxidoreductaza fosforilantă (sau gliceraldehidfosfat dehidrogenaza).

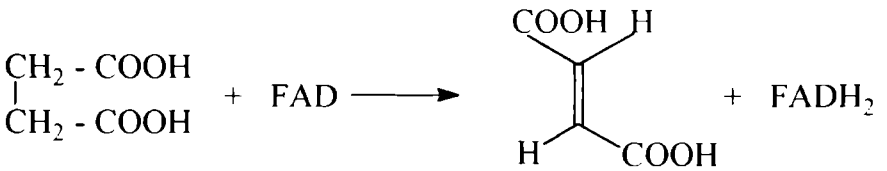
Deşi au activitate identică, aceste trei enzime diferă prin natura coenzimei implicate ca şi prin acţiunea secundară fosforilantă a ultimelor două.

Altă enzimă din această categorie, gluco-6-fosfat dehidrogenaza, dependentă de $NADP^+$, implicată în metabolismul oxidativ al glucidelor, catalizează conversia D-glucozo-6-fosfatului în acid 6-fosfat-D-gluconic:



V.3.1.3. Enzime FAD-dependente

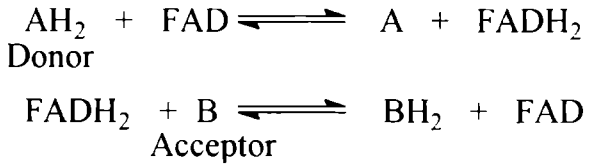
Aceste oxidoreductaze implică prezenţa unor flavinnucleotide (IV.2.5.4 şi vit. B_2). Astfel, succinat dehidrogenaza catalizează conversia acidului succinic la acid fumaric:



În acest caz, coenzima (FAD) este legată covalent de apoenzimă.

Pe lângă specificitatea sa de substrat, această enzimă este şi stereoselectivă, conducând la diastereo-izomerul trans (E) al produsului de reacţie.

Flavin-enzimele intervin în lanţul oxidărilor celulare. Unele dintre ele acţionează ca dehidrogenaze anaerobe. Transferul de hidrogen între două substrate (donor şi acceptor) se face prin intermediul FAD:



https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În cazul dehidrogenazelor aerobe, transferul are loc de la un substrat donor direct la oxigenul molecular (acceptor):

$$\underset{\text{Donor}}{AH_2} + FAD \rightleftharpoons A + FADH_2$$

$$FADH_2 + \underset{\text{Acceptor}}{O_2} \rightleftharpoons H_2O_2 + FAD$$

V.3.1.4. Oxidoreductaze de natură hemoproteică (hemoenzime)

Din această clasă fac parte catalaza şi peroxidazele.

A.Peroxidazele sunt hemoproteine care utilizează apa oxigenată în calitate de oxidant şi donori de hidrogen ca: iodura, clorura, palmitatul, NADH etc. Schema generală a unei asemenea transformări va fi:

$$H_2O_2 + \underset{\text{Donor}}{AH_2} \rightleftharpoons 2H_2O + \underset{\text{Donor oxidat}}{A}$$

$$H_2O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons 2H_2O$$

În calitate de substrat (donor) pot reacţiona: fenoli, amine, acid ascorbic, indol etc.

-Acesta este şi cazul donor: peroxid de hidrogen oxidoreductazei (E.C.1.11.1.7) sau peroxidaza din plantele inferioare şi superioare, microorganisme şi ţesuturi animale.

-Ferocitocrom c: peroxid de hidrogen oxidoreductaza (E.C.1.11.1.8) catalizează reacţia:

$$2\text{ferocitocrom c} + H_2O_2 \longrightarrow 2\text{ferocitocrom c oxidat} + 2H_2O$$

B.Catalaza sau H_2O_2: H_2O_2 oxidoreductaza (E.C.1.11.1.6) descompune apa oxigenată:

$$\underset{\substack{\text{Donor}\\(\text{se oxidează})}}{H_2O_2} + \underset{\substack{\text{Acceptor}\\(\text{se reduce})}}{H_2O_2} \rightleftharpoons 2H_2O + O_2$$

Catalaza şi peroxidazele intervin în metabolizarea apei oxigenate (toxică pentru organism).

Cu ajutorul acestor enzime se realizează controlul pasteurizării unor produse alimentare. Alimentele incomplet pasteurizate conţin urme detectabile din aceste enzime.

V.3.1.5. Hidrogenaze

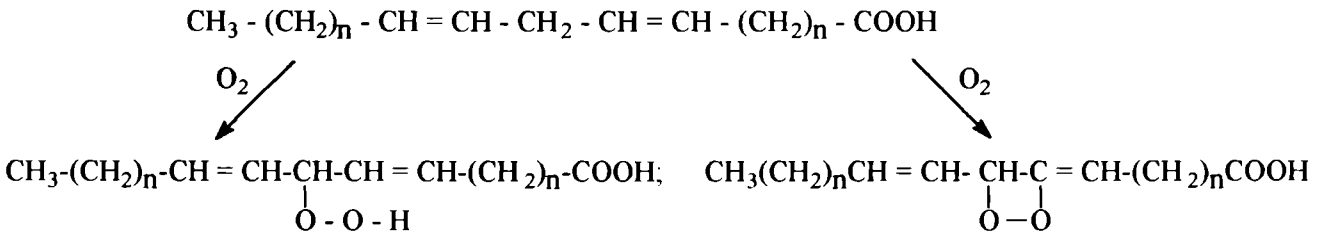
Enzimele cu acest nume generic constituie subclasa 1.12. şi utilizează hidrogenul gazos ca substrat reducător. Acceptorii sunt NAD^+ sau $NADP^+$ (1.12.1) un citocrom (1.12.2) şi o sulf-fier-proteină (1.12.7).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

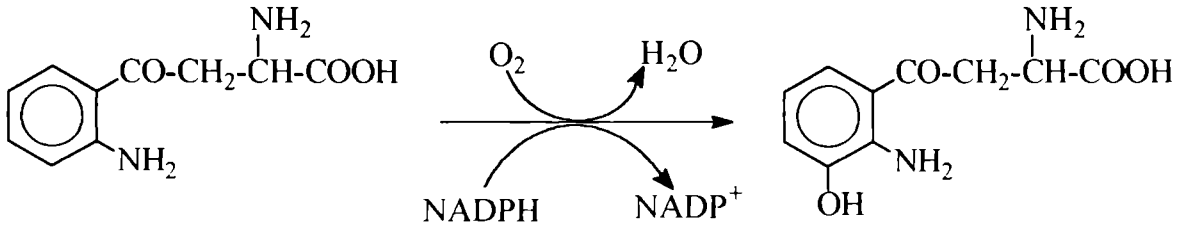
V.3.1.6. Oxigenaze

-Enzimele din subclasa 1.13 acționează asupra unui singur donor de hidrogen, cu încorporarea concomitentă a oxigenului molecular. Pot fi încorporați: doi atomi de oxigen (subclasa 1.13.11), un singur atom de oxigen (subclasa 1.13.12); cazurile incomplet elucidate s-au inclus în sub-subclasa 1.13.99.

-Unele enzime ale subclasei 1.13 conțin ioni de Fe^{2+}, conducând și la reacții secundare de ciclizare. Astfel, linoleat: oxigen-oxidoreductaza (E.C.1.13.11.12) sau lipoxigenaza catalizează peroxidarea acizilor grași nesaturați, cu formarea unor peroxizi ciclici și aciclici:



-Subclasa 1.14 reprezintă enzime care catalizează transferul de hidrogen pe o moleculă de oxigen, urmat de încorporarea oxigenului pe unul din cele două substrate sau pe ambele. De exemplu, L-kinurenin NADPH: oxigen oxidoreductaza (3-hidroxilantă) – E.C.1.14.13.9 sau kinurenin-3-monooxigenaza catalizează hidroxilarea kinureninei:



Kinurenina — 3-Hidroxi-kinurenina

Această enzimă se găsește în celulă, în membrana exterioară a mitocondriei și are specificitate pentru L-kinurenină.

-Subclasa 1.15 include enzima superoxid:superoxid oxidoreductaza (1.15.1.1) sau superoxid dismutaza, o metaloproteină care catalizează dismutația radicalilor peroxidici:

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \longrightarrow O_2 + H_2O_2$$

-Subclasa 1.16 este reprezentată de Fe^{II}:oxigen oxidoreductaza (E.C.1.16.3.1) sau feroxidaza; enzima catalizează reacția de oxidare a Fe^{2+} (donor de electroni):

$$4Fe^{2+} + 4H^+ + O_2 \longrightarrow 4Fe^{3+} + 2H_2O$$

Această enzimă este denumită și ceruloplasmina.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

V.3.2. Transferazele (clasa E.C. 2)

Aceste enzime catalizează transferul unor grupe (în afară de hidrogen) între două substrate:

$$\underset{\text{Donor}}{A - R} + \underset{\text{Acceptor}}{B} \rightleftharpoons A + B - R \qquad R \neq H$$

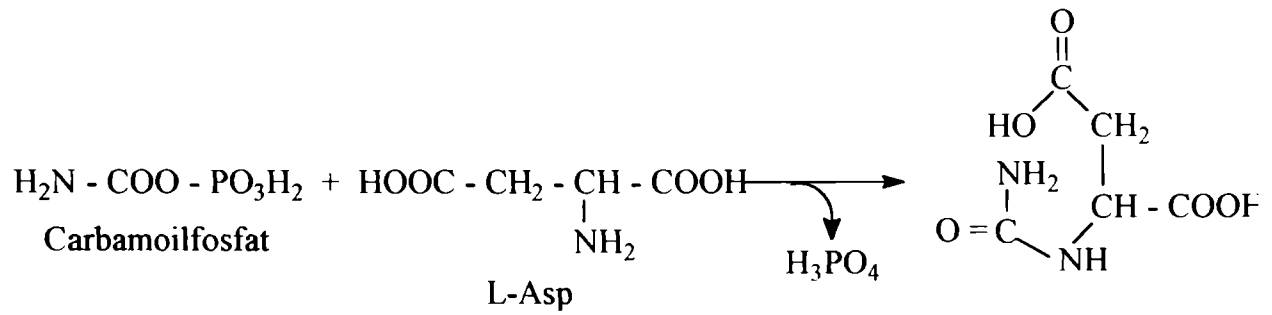
Grupele R transferate pot fi: carbonil, carboxil, acil, alchil, glicozil, fosfat, amină primară, grupe funcționale cu S, P, As etc.

V.3.2.1. Aciltransferaze

A.Aciltransferaze din subclasa 2.1

Aceste transferaze pot fi: transcarboxilaze (catalizează transferul de grupe COOH) sau transcarbamilaze (catalizează transferul de grupe carbamoil).

Astfel, carbamoilfosfat: L-aspartat carbamoil transferaza (E.C.2.1.3.2) sau aspartat-carbamoil transferaza, catalizează reacția:



Carbamoilfosfat

L-Asp

Această reacție este prima secvență din sinteza piridinnucleotidelor.

B.Aciltransferaze din subclasa 2.3

Enzimele din această subclasă catalizează transferul grupelor acil de pe un substrat donor (acil-coenzimele A) pe un substrat acceptor ca: glucide, aminoacizi, amine, colină.

Colinesteraza (CHE) este o seril-enzimă, secretată activ de hepatocite, cu număr de cod E.C.2.3.1.6. Această enzimă reprezintă un caz aparte din categoria esterazelor.

Colinesteraza joacă un rol esențial în mecanismul transmiterii impulsurilor nervoase în sistemul nervos parasimpatic. Impulsul nervos care străbate un neuron este transmis prin axon. La nivelul joncțiunii dintre doi neuroni sau dintre un nueron şi o celulă musculară, transmisia se realizează printr-o sinapsă (transmisie sinaptică). Transmisia axonică este de natură electrică, în timp ce transmisia sinaptică este de natură chimică. Transmisia axonică se stinge la întâlnirea cu o sinapsă.

Acetilcolina este un neurohormon care joacă rol de mediator chimic în transmisia sinaptică şi se eliberează în vecinătatea membranei presinaptice. Mediatorul, traversând sinapsa, poate provoca un nou potențial de acțiune (dacă sinapsa este între doi neuroni) sau o acțiune (dacă sinapsa este între un neuron şi un efector – muşchi sau glandă).

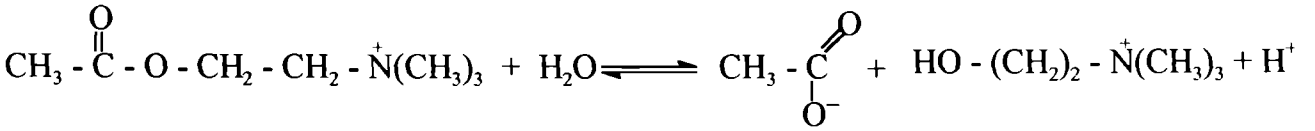
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Mediatorul chimic pe partea presinaptică este acetilcolina, formată printr-o acetilare a colinei cu acetil-coenzima A, sub influența colinesterazei:

Colină Acetilcolină

Acetilcolina astfel formată în membrana presinaptică determină depolarizarea acesteia şi, ca rezultat al depolarizării, transmiterea impulsului nervos muşchilor.

Proprietățile membranei postsinaptice sunt restaurate prin hidroliza acetilcolinei sub acțiunea CHE:



Membrana devine astfel aptă pentru transmiterea unui nou impuls. Sinapsele pot transmite 1000 impulsuri/sec, doar dacă membrana postsinaptică își recuperează starea inițială într-o fracțiune de milisecundă.

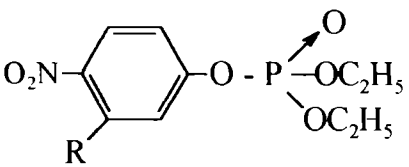
Blocarea enzimei cu inhibitori de colinesterază (medicamente, pesticide organo-fosforice sau carbamați) face ca refacerea sa să fie foarte lentă. În consecință, enzima rămâne inactivă şi în organism se acumulează acetilcolina, provocând tulburări ale sistemului nervos sau chiar moartea.

Colinesteraza (CHE) prezintă două centre active:

-centrul anionic care conține grupe COO^- provenite dintr-un rest de Glu sau Asp, alături de o grupă cu caracter bazic (un rest imidazolic din His). Acest centru are rolul de a fixa partea cationică a acetilcolinei;

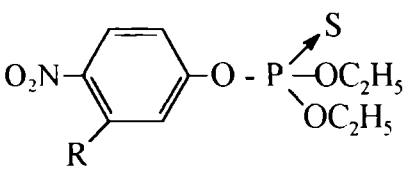
-centrul esteric, care conține o grupă alcool primar dintr-un rest de Ser, alături de o grupă acidă şi un rest bazic (probabil din His), cu rol de activatori.

Acetilcolina reacționează cu restul de Ser din CHE. În figurile V.14 şi V.15 este indicată schema acțiunii situsului activ al CHE, în absența şi (respectiv) în prezența unui insecticid organofosforic de forma:



în care: R=H (Paraoxon)

sau



în care: R=H (Paration);
R=Cl (Clortion) etc

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

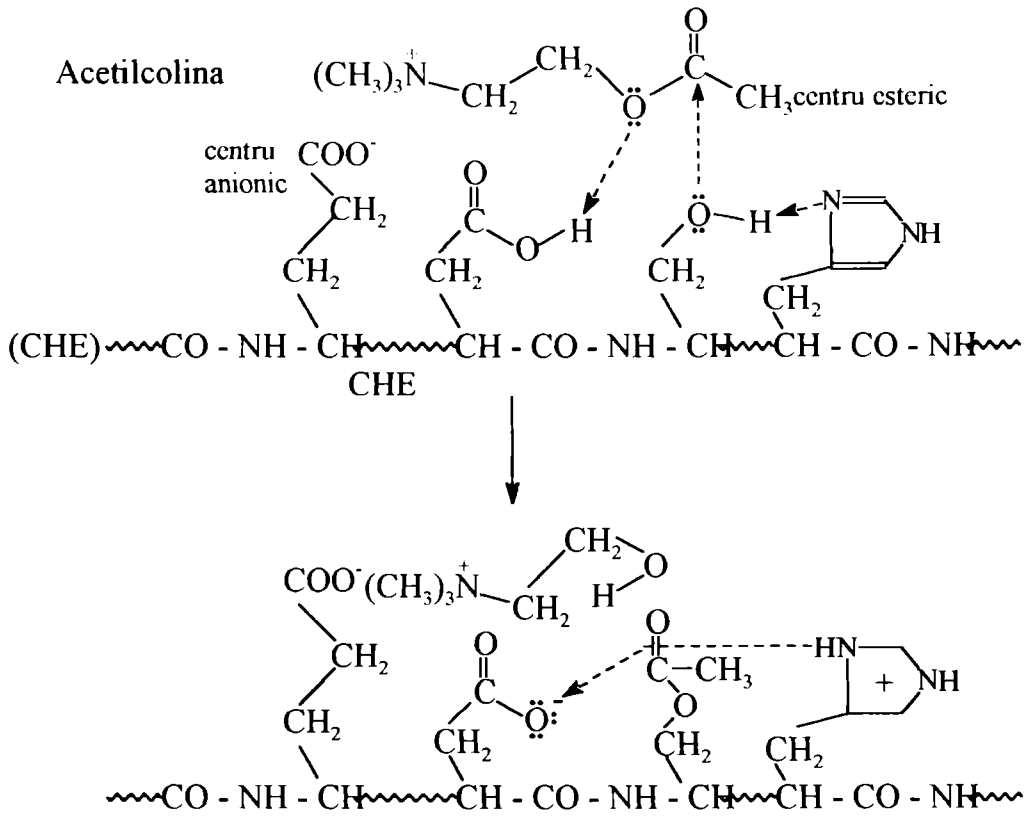


Fig.V.14 – Modul de acțiune a situsului activ al colinesterazei

Insecticidele organo-fosforice blochează colinesteraza prin fosforilare, dezactivând-o (fig.V.15).

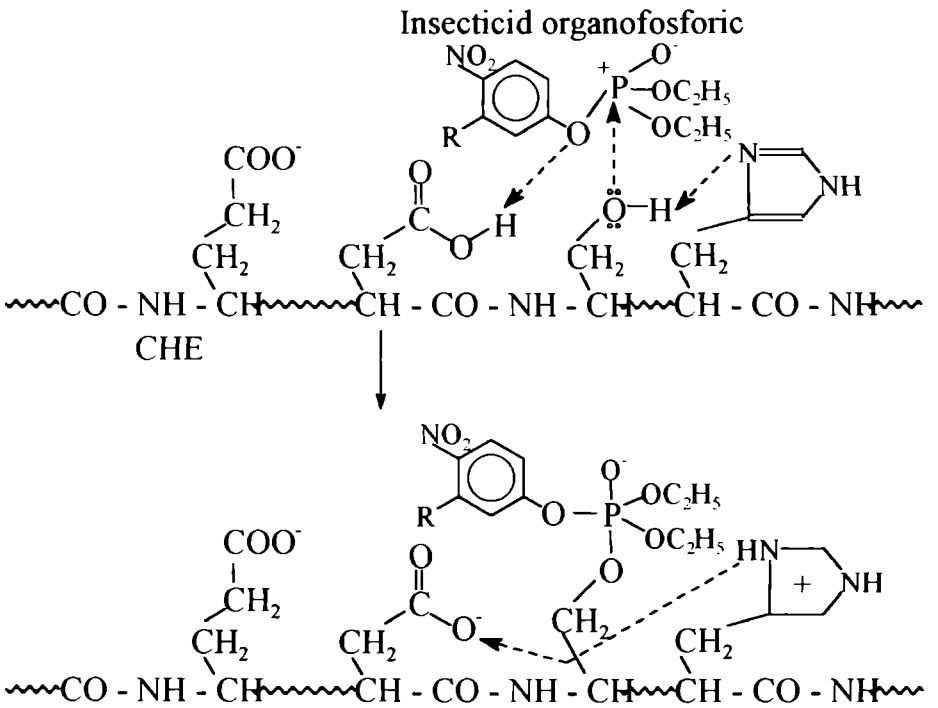
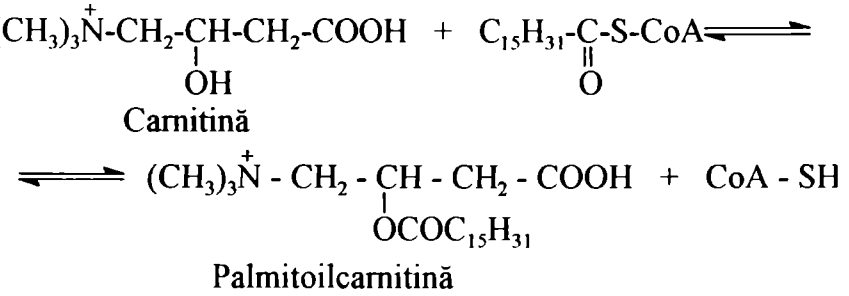


Fig.V.15 – Efectul insecticidelor organofosforice asupra centrului activ al CHE

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Mutațiile genetice afectează activitatea CHE. Scăderi ale concentrației colinesterazei în organism sunt provocate de afecțiuni ca: ciroză hepatică, intoxicații cu compuși organofosforici, denutriție, hipotiroidism, anemii etc. Sindromul nefrotic și obezitatea androidă sunt semnalate de creșteri ale concentrației CHE.

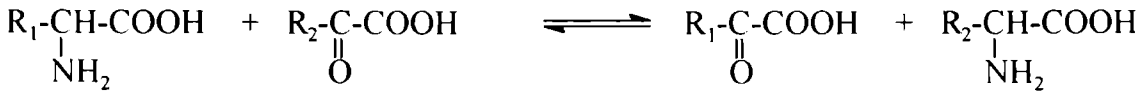
Un alt caz de aciltransferază din subclasa 2.3 este cel al carnitin-palmitoiltransferazei sau palmitoil-CoA: L-carnitină O-palmitoiltransferaza (E.C.2.3.1.21), care catalizează transferul unei grupe palmitoil de la coenzima A acilată la carnitină:



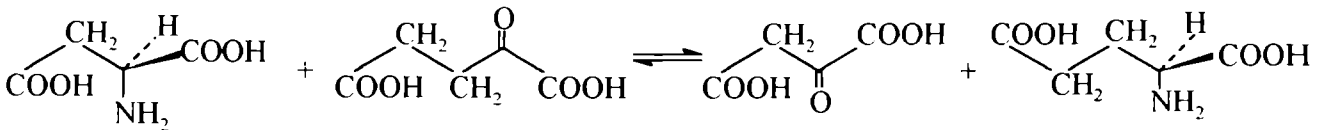
Acest tip de proces stă la baza penetrării membranei interne a mitocondriilor de către esterii acizilor grași. După reacția de transfer de grupe acil de la coenzima A acilată la carnitină se formează acil-carnitină care penetrează membrana internă mitocondrială fie prin difuzie, fie cu ajutorul unui transportor.

V.3.2.2. Aminotransferaze (transaminaze) – subgrupa 2.6.1

Aceste enzime catalizează transferul de grupe NH_2 de pe molecula unui α-aminoacid pe molecula unui α-cetoacid, conform schemei generale (II.4.2):



-L-aspartat: 2-oxiglutarat aminotransferaza (E.C.2.6.1.1) sau aspartat aminotransferaza se găsește în ficat, miocard, mușchi și (în cantități mici) în: plămâni, rinichi, pancreas, eritocite. Enzima catalizează reacția:

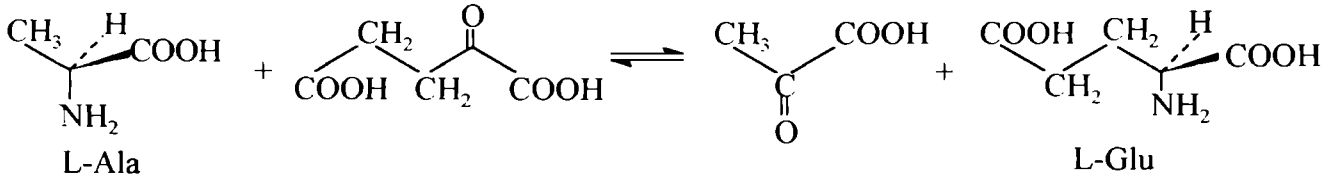


L-Asp 2-Oxo-glutarat Oxalilacetat L-Glu

Creșteri marcate ale concentrației aspartat-aminotransferazei se observă în: infarctul miocardic, hepatita acută etc., iar hepatitele cronice, colicile biliare și mononucleoza infecțioasă determină creșteri moderate.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

-Alanin-aminotransferaza (E.C.2.6.1.2) sau L-alanin: 2-oxoglutarat aminotransferaza catalizează reacția:

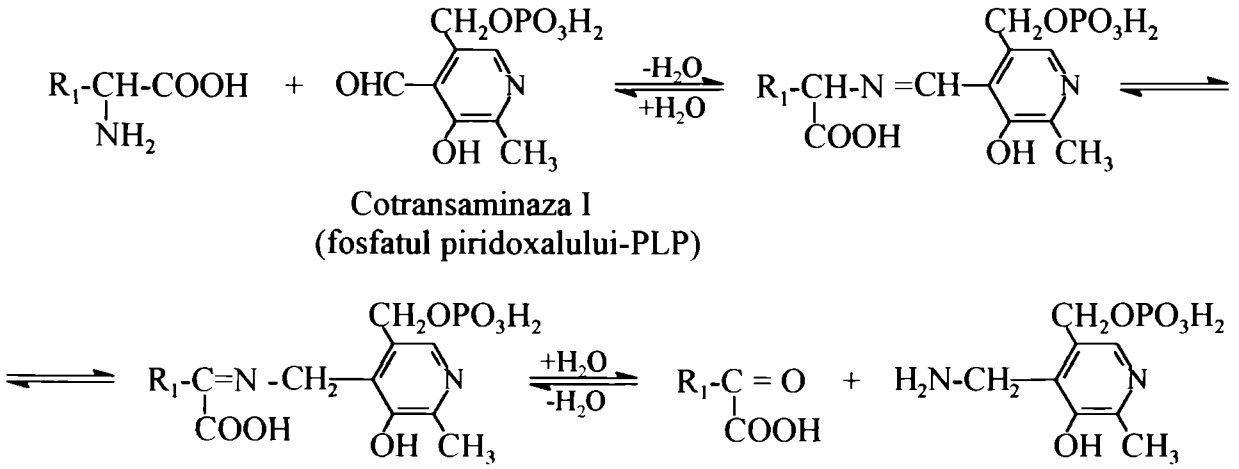


L-Ala L-Glu

Enzima se găseşte în citosolul hepatocitelor şi în: rinichi, pancreas, miocard, muşchi.

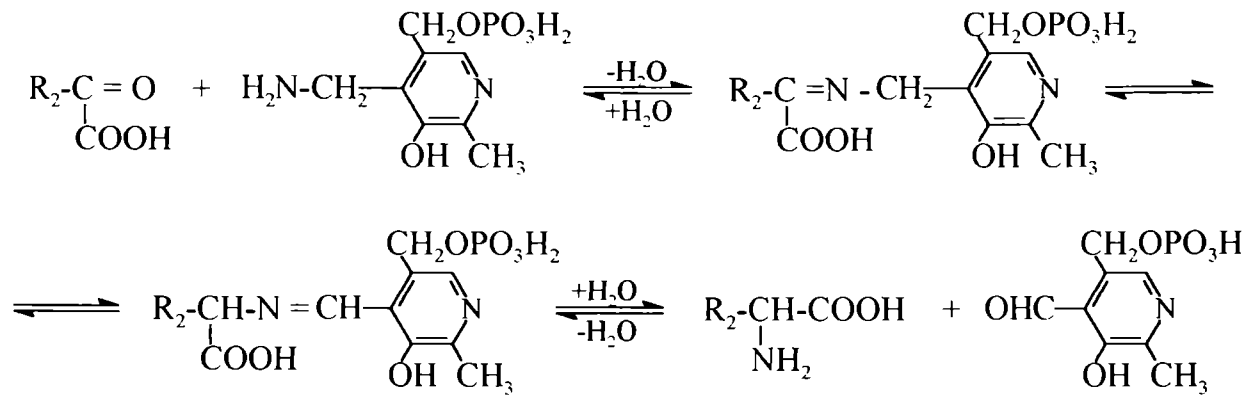
Creşteri ale concentrației de alanin-aminotransferază în organism se semnalează în afecțiuni ca: hepatita acută, leziuni toxice ale ficatului, mononucleoza infecțioasă, colici biliare.

În toate cazurile de aminotransferaze, coenzimele sunt derivați ai piridoxinei (vitamina B_6), mecanismul "ping-pong" (II.4.2) putând fi schematizat sumar:



Cotransaminaza I
(fosfatul piridoxalului-PLP)

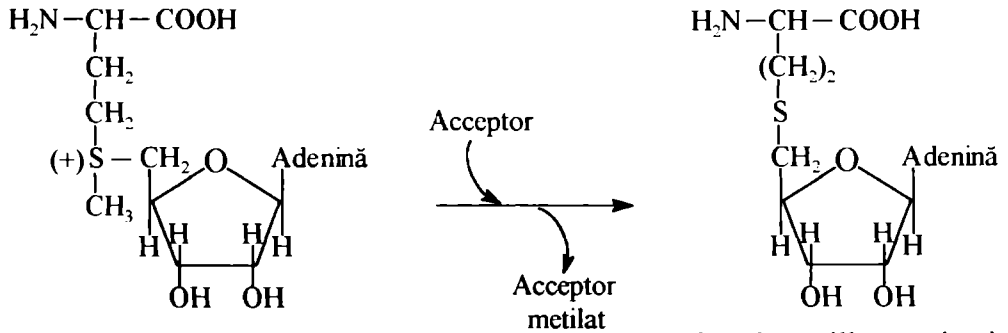
Cotransaminaza II
(fosfatul piridoxaminei-PMP)



V.3.2.3. Metiltransferaze

Metiltransferazele catalizează transferul de grupe CH_3 de pe S-adenozil-L-metionină (donor) pe acceptori ca: nicotinamidă, guanidinoacetat, N-acetil-serotonină etc., după schema generală:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

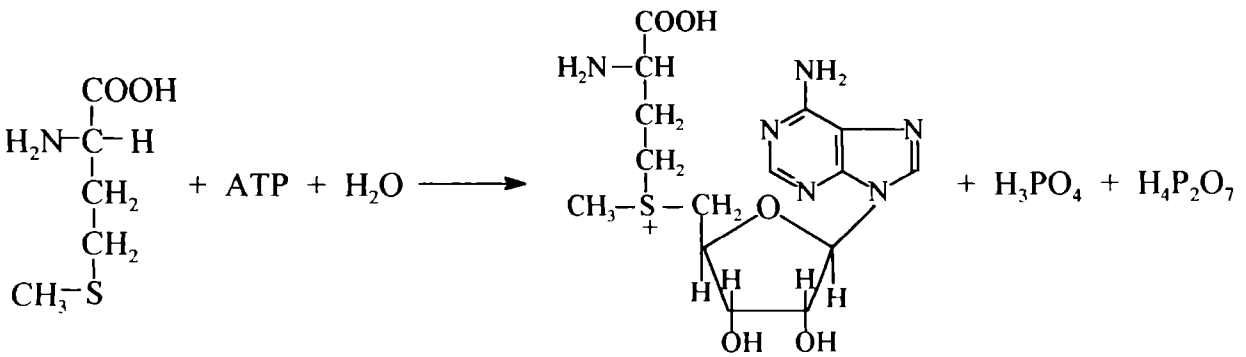


S-Adenozilhomocisteină

V.3.2.4. Alte alchiltransferaze

Din această categorie fac parte enzimele care catalizează transferul unor grupe alchil (diferite de grupa metil şi de grupa aril), încadrate în subclasa 2.5.

Este cazul enzimei ATP: L-metionin-S-adenozil-transferaza (E.C.2.5.1.6), care catalizează biosinteza S-adenozil-L-metioninei (pag. 75):



Met S-Adenozilmetionină

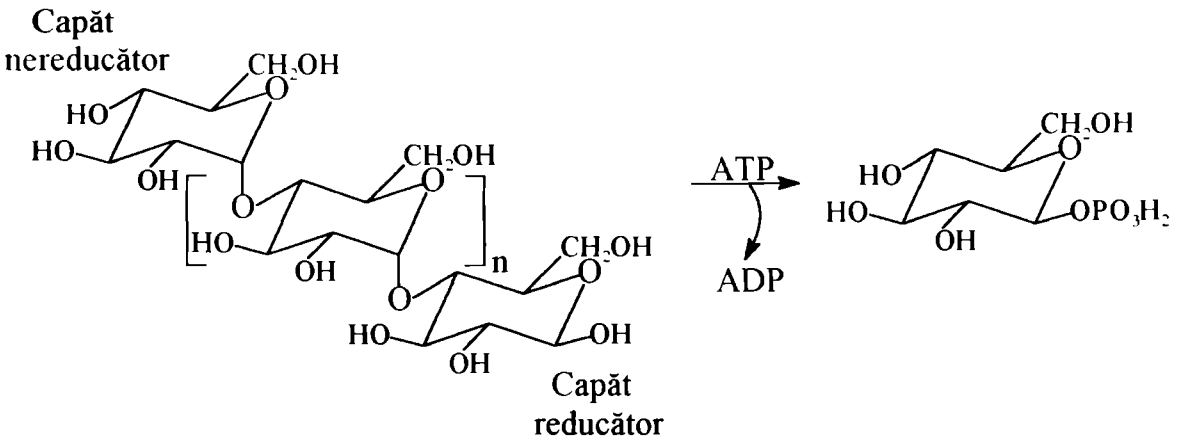
Enzima a fost izolată din drojdia de bere şi este dependentă de cationii Mg^{2+} sau Mn^{2+}.

V.3.2.5. Glicozil-transferaze

În această subclasă pot fi incluse şi fosforilazele, dacă se consideră că restul glicozil este transferat pe ortofosfat (acceptor).

Unele enzime din această subclasă (2.4) au activitate hidrolitică; în aceste caz se consideră că restul glicozil este transferat pe o moleculă de apă. Astfel, fosforilaza sau 1,4-α-D-glucan: ortofosfat-α-glucoziltransferaza (E.C.2.4.1.1) catalizează transferul restului glicozil de la glicogen la fosfat, prima secvență a glicolizei:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Enzima reacționează repetitiv asupra capătului nereducător al lanțului, producând, alături de fosforilarea în poziția 1 a resturilor de D-glucoză și o rupere a lanțului.

V.3.2.6. Fosfotransferazele

Fosfotransferazele (subclasa 2.7) catalizează transferul unei grupe cu fosfor, ca: fosfat, difosfat, nucleotidil. Acceptori pot fi grupele: OH, COOH, NH_2 etc.

Transferul de grupe fosfat de la ATP la un substrat este catalizat de kinaze.

Termenul de pirofosfokinaze se referă la transferul de grupe pirofosfat, iar cel de fosfomutaze – la un transfer intramolecular (o izomerizare).

-Astfel, ATP: D-hexozo-6-fosfotransferaza (E.C.2.7.1.1) sau hexokinaza, catalizează o reacție de tipul:

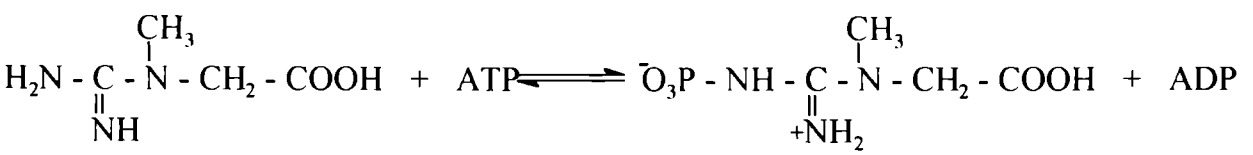
ATP + D-hexoză ⟶ ADP + D-hexozo-6-fosfat

Hexozele care participă la această reacție sunt: D-glucoza, D-fructoza, D-manoza, D-glucozamina și 2-deoxi-D-glucoza.

Enzima se găsește în complexul din drojdia de bere.

-Creatin-kinaza este un complex de două izoenzime, care se găsesc în: creier (CK-BB); mușchi (CKMM) și miocard (CKMB), litera M indicând ca sursă mușchii; litera B – ca sursă creierul (vezi paragraful V.2.8).

Mușchii și nervii celulari reprezintă un rezervor de energie liberă, care funcționează pentru regenerarea rapidă a ATP. În vertebrate, fosfocreatina se sintetizează prin fosforilarea reversibilă a creatinei cu ATP, sub acțiunea creatin-kinazei:



Deși în condiții standard această reacție este endotermă, la concentrațiile intracelulare de reactanți și produși ea este o reacție de echilibru.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Când concentrațiile în ATP se măresc, reacția are loc cu formarea de fosfocreatină, iar când în cursul proceselor metabolice concentrația ATP scade, echilibrul se deplasează spre formare de ATP. În acest mod fosfocreatina acționează ca un "tampon" ATP în celulele care conțin creatinkinază.

În mușchii scheletului vertebratelor există în mod normal suficientă fosfocreatină pentru a asigura energia liberă a lor timp de câteva minute.

Creşteri importante ale concentrației de creatinkinază din organism se observă în infarctul miocardic, ca şi în alte afecțiuni ca: dermatomiozitele şi distrofia musculară progresivă, iar creşterile moderate se produc în hipotiroidism, ca şi în cazul injectării intramusculare de tetraciclină şi diazepam.

V.3.2.7. Transferaze ale grupelor cu sulf

Enzimele subclasei 2.8 catalizează transferul grupelor funcționale cu sulf; în acest mod se pot transfera: atomi de sulf, grupe sulfat şi coenzima A.

Este şi cazul enzimei acetil-CoA: malonat CoA-transferaza (E.C.2.8.3.3), care catalizează transferul de coenzimă A pe catena unor acizi dicarboxilici, intervenind în sinteza acizilor graşi:

$$CoA\text{-}S\text{-}COCH_3 + \underset{\text{Acid malonic}}{HOOC\text{-}CH_2\text{-}COOH} \longrightarrow CH_3COOH + HOOC\text{-}CH_2\text{-}CO\text{-}S\text{-}CoA$$

V.3.3. Hidrolaze (clasa E.C.3)

Hidrolazele sunt enzime care catalizează transformările hidrolitice ale moleculelor de substrat, scindând legăturile grupelor: ester, eter, peptidă, anhidridă acidă, glicozil, ca şi legături C-halogen, C-P, P-N etc. În funcție de grupele funcționale asupra cărora acționează, hidrolazele pot fi: esteraze, fosfoesteraze (fosfataze), tioesteraze, amilaze, peptidaze etc.

V.3.3.1. Esteraze şi glicozidaze

A.Lipaza sau triacilglicerol-acilhidrolaza (E.C.3.1.1.3) catalizează hidroliza esterilor glicerinei cu acizii graşi (gliceridele):

$$\begin{array}{l} CH_2OCOR_1 \\ | \\ CHOCOR_2 \\ | \\ CH_2OCOR_3 \end{array} + H_2O \longrightarrow \begin{array}{l} CH_2OH \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2OH \end{array} + R_1COOH + R_2COOH + R_3COOH$$

Lipaza acționează asupra substratului emulsionat şi are o mare importanță în digestia grăsimilor. Enzima se mai utilizează ca adaos la medicamentele care conțin fermenți digestivi, pentru tratarea deficiențelor în metabolismul lipidelor. De asemenea, lipaza se foloseşte şi la condiționarea biodetergenților, drept emulgator în panificație şi cofetărie etc.

Fosfolipazele hidrolizează specific legăturile carboxi-esterice din poziția 1 sau 2 a moleculelor fosfolipidelor şi, mai geu, grupa ester din poziția 2.

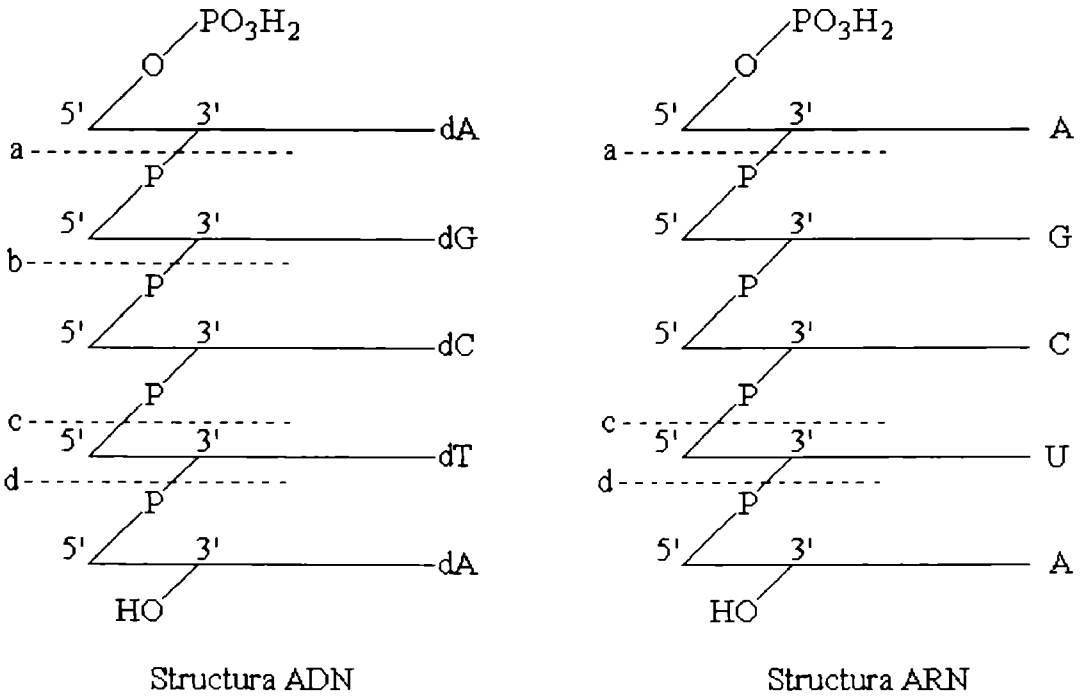
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

B.Fosfodiesterazele scindează hidrolitic legăturile fosfodiesterice. În această categorie se remarcă nucleazele (ADN-aze şi ARN-aze), care pot fi endo- şi exonucleaze. În ADN acţionează ca endonucleaze ADN-aza I şi ADN-aza II.

ADN-aza I scindează în interior catenele deoxiribonucleotidice (fig.V.14) cu formare de oligodeoxiribonucleotid-5'-fosfat (b), iar ADN-aza II conduce la oligodeoxiribonucleotid-3'-fosfat (c).

În ARN, endonucleazele hidrolizează în interior catenele ribonucleotidice, exclusiv la nivelul legăturii 5'-fosfat, rezultând oligoribonucleotid-3'-fosfat (c).

Exonucleazele acţionează atât asupra ADN cât şi asupra ARN, detaşând succesiv nucleotide de la capetetele catenelor (a şi d).



Structura ADN Structura ARN

Fig.V.14 – Schema acţiunii hidrolitice a exo- şi endonucleazelor

C.Glicozidazele (glicozid hidrolazele) catalizează hidroliza legăturilor glicozidice din oligo- şi poliglucide:

$$G_1 - O - G_2 + H_2O \longrightarrow G_1OH + G_2OH$$

în care G_1 şi G_2 sunt resturi mono, oligo sau poliglucidice.

Aceste enzime prezintă o specificitate dependentă de tipul legăturii glicozidice (α şi β), de natura resturilor monoglucidice, ca şi de familia (seria) sterică D sau L căreia îi aparţin fragmentele de monoglucide.

Astfel, este binecunoscut cazul zaharozei care poate fi hidrolizată sub acţiunea a două enzime specifice: α-glucozidaza (maltaza) şi β-fructozidaza (invertaza).

Alt exemplu este cel al α- şi β-amilazelor, care hidrolizează amidonul la maltoză şi dextrine.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

α-Amilaza este o endoenzimă, scindând legăturile α-1,4-glicozidice din moleculele amidonului şi glicogenului, pe când β-amilaza este o exoenzimă, care hidrolizează legăturile α-1,4-glicozidice începând numai de la capătul nereducător al catenelor.

Celulazele catalizează scindarea hidrolitică a legăturilor β-1,4-glicozidice din lanțul poliglucidic al celulozei, detaşând fragmente de celobioză. Celobioza poate fi hidrolizată de celobiază, cu formarea β-D-glucopiranozei.

D.Peptidazele (peptidhidrolaze) catalizează hidroliza legăturilor peptidice. Aceste hidrolaze pot avea o specificitate mai largă sau mai restrânsă, pot acționa asupra legăturilor din interiorul unei catene polipeptidice (endopeptidaze) sau asupra celor de la extremitățile catenei (exopeptidaze).

1°Endopeptidazele sunt reprezentate de enzimele proteolitice de digestie (tripsina, chimotripsina, pepsina) şi catepsinele.

-Tripsina este biosintetizată în pancreasul exocrin, sub forma precursorului inactiv (zimogen) denumit tripsinogen, cu masa moleculară de 23,7-25,7KDa, monocatenar, compus din 229 resturi de aminoacizi. Ajuns în intestinul subțire, tripsinogenul este transformat în tripsină, prin îndepărtarea din molecula zimogenului a unui fragment hexapeptidic de la capătul N-terminal, cu secvența Val-$(Asp)_4$-Lys, sub acțiunea enterokinazei, sau autocatalitic (prin autoliză). Fragmentul îndepărtat joacă rol de inhibitor natural al tripsinei.

Tripsina hidrolizează specific, la pH=7-9, legăturile peptidice din peptide şi proteine, formate din resturile de Arg şi Lys prin grupa carboxilică (exceptând His), ca şi legăturile amidice şi esterice formate de aceşti aminoacizi.

-Chimotripsina este biosintetizată în pancreasul exocrin sub forma zimogenului inactiv – chimotripsinogenul, cu o singură catenă polipeptidică formată din 245 resturi de aminoacizi, având cinci legături disulfurice intracatenare. La nivelul intestinului subțire, chimotripsinogenul este fragmentat consecutiv de chimotripsină şi tripsină, prin detaşarea unui fragment dipeptidic conținând aminoacizii Ser (14) şi Arg (15) şi a altui fragment care conține Thr (147) şi Asn (148). Rezultă α-chimotripsina, cu structură tricatenară şi activitate catalitică.

După eliminarea celor două fragmente dipeptidice, au loc modificări conformaționale în structura α-chimotripsinei, care avantajează apropierea restului de His (57) de restul de Ser (195) aflate pe catene diferite (fig.V.15). În acest mod se formează structura situsului catalitic.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

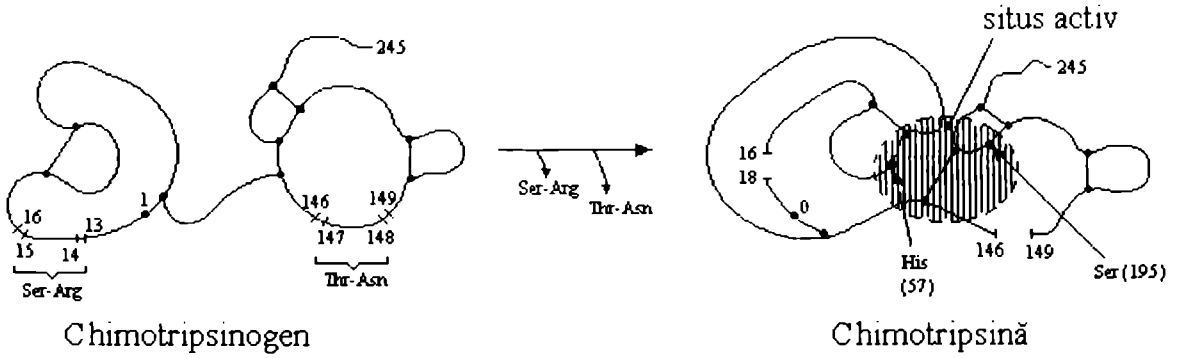


Fig.V.15 – Conversia chimotripsinogenului la chimotripsină

Chimotripsina are a acțiune peptidazică optimă la pH=8-9 şi o largă specificitate de substrat. Enzima are, pe lângă activitatea peptidazică şi o activitate esterazică.

Chimotripsina hidrolizează legăturile peptidice pe care le formează resturile diaminoacizilor monocarboxilici, ca şi cele ale α-aminoacizilor cu catenă aromatică, dar poate scinda şi alte legături peptidice.

Mecanismul acțiunii peptidazice include participarea resturilor de His (57) şi Ser (195) din situsul activ al enzimei (fig.V.16).

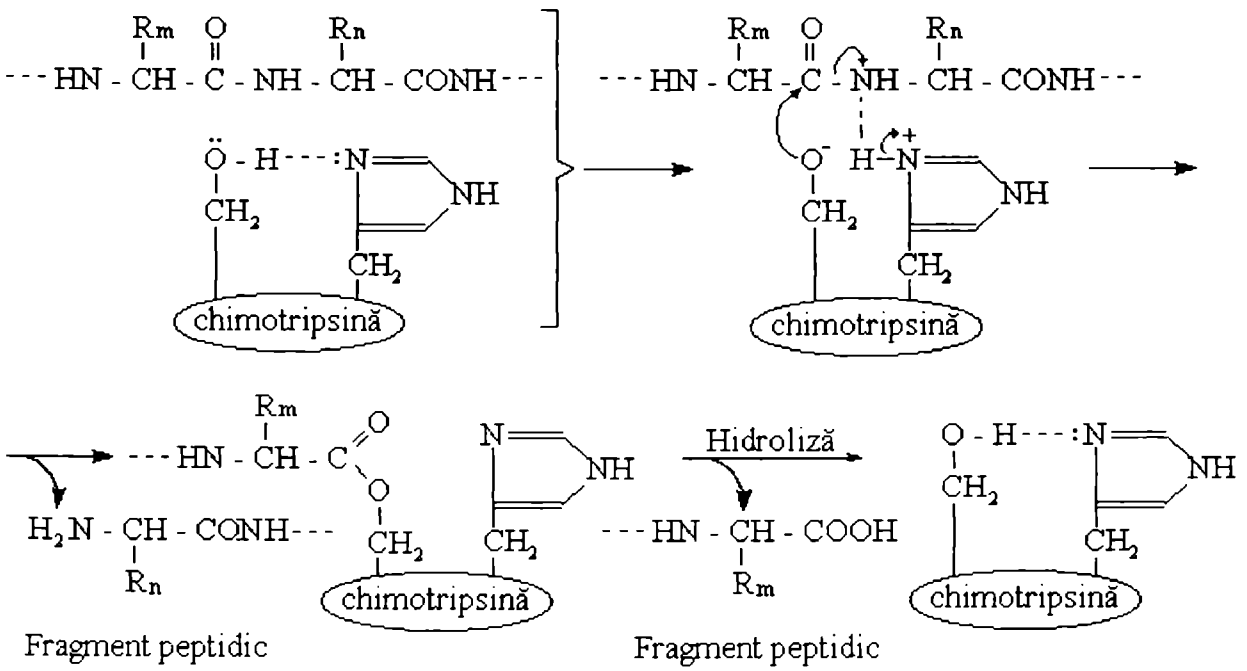


Fig.V.16 – Acțiunea peptidazică a chimotripsinei

-Pepsina este biosintetizată în mucoasa stomacală sub forma precursorului inactiv (pepsinogen), o proteină monocatenară cu masa moleculară de 39KDa.

La pH<5, pepsinogenul se transformă în pepsina activă, printr-o autoliză, în cursul căreia se elimină anumite fragmente peptidice, printre care şi fragmentul corespunzător inhibitorului natural al enzimei.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Pepsina are masa moleculară de 35KDa şi o structură monocatenară, conținând trei punți disulfurice. Datorită conținutului ridicat de resturi de aminoacizi dicarboxilici, pepsina are caracter acid; enzima, conținută în sucul gastric, are un pH optim de 1,5-2,5. Pe lângă acțiunea sa, în principal proteolitică, pepsina mai are şi acțiune peptidazică, transpeptidazică şi esterazică.

În acțiunea proteolitică, pepsina are o largă specificitate, hidrolizând de preferință legăturile peptidice formate între aminoacizii aromatici (Phe, Tyr) şi un aminoacid dicarboxilic, ca şi legături peptidice în care sunt implicate Met, Leu etc.

2°Exopeptidaze

Aceste enzime sunt metaloproteine care conțin ioni de Zn^{2+} şi Mg^{2+}; elaborate şi secretate de mucoasa intestinală, acționează în intestin dar sunt prezente şi în alte țesuturi.

Exopeptidazele hidrolizează legăturile peptidice de la extremitățile catenelor polipeptidice şi proteinice până la aminoacizi.

În organism, exopeptidazele intervin în procesul de digestie, completând acțiunea endopeptidazelor. După poziția legăturilor pe care le scindează, aceste enzime pot fi amino- sau carboxipeptidaze.

-Aminopeptidazele acționează asupra legăturii peptidice de la capătul N-terminal al catenelor, detaşând succesiv resturi de aminoacizi, în funcție de specificitatea lor.

În această categorie intră: leucinaminopeptidaza, aminopeptidazele A şi B şi aminotripeptidaza.

-Carboxipeptidazele se găsesc în sucul pancreatic al animalelor sub formă de procarboxipeptidaze: procarboxipeptidaza A şi procarboxipeptidaza B. Sub actiunea tripsinei, din procarboxipeptidaze sunt eliberate enzimele active respective.

Ionul metalic din carboxipeptidaze face parte din centrul catalitic. Carboxipeptidazele hidrolizează succesiv legăturile peptidice de la capătul C-terminal al catenelor peptidice.

Carboxipeptidaza A este o zinc-enzimă oligomeră, formată din trei subunități şi are masa moleculară de 87KDa. Enzima detaşează, printr-o hidroliză mai lentă sau mai rapidă, toți aminoacizii din proteine, cu excepția Arg, Pro şi hidroxiprolinei.

În intervalul de pH=5,5-10,5 carboxipeptidaza A are şi acțiune esterazică, a cărei valoare este maximă la limita superioară a intervalului.

Carboxipeptidaza B (peptidil-L-lisin-hidrolaza) este de asemenea o zinc-enzimă, cu structură monocatenară, formată din circa 300 resturi de aminoacizi, conținând trei legături disulfurice şi o grupă SH (care joacă, probabil, rol în ataşarea ionului Zn^{2+} la apoenzimă).

Enzima are o specificitate mai restrânsă decât carboxipeptidaza A, detaşând selectiv numai resturile de Arg şi Lys implicate în legăturile peptidice de la capătul C-terminal al lanțurilor polipeptidice. În mod asemănător cu carboxipeptidaza A, carboxipeptidaza B are şi o acțiune esterazică.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

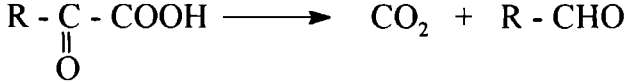
V.3.4. Liaze (clasa E.C.4)

Aceste enzime catalizează reacții de eliminare din substrate a unor grupe funcționale, ca rezultat al ruperii unor legături de tip: C-C, C-O, C-N, C-S, C-P, C-halogen etc., prin mecanisme diferite de cel al hidrolizei. Asemenea legături, fiind extrem de variate, există şi o mare varietate de enzime specifice ruperii lor. Dintre acestea, vom insista asupra unor cazuri mai reprezentative.

Uneori, reacțiile catalizate de liaze sunt reversibile. Dacă reacția inversă predomină sau dacă numai aceasta a fost demonstrată, aceste enzime pot fi denumite generic şi sintaze (dar nu sintetaze).

În cadrul general al liazelor (clasa 4), al doilea termen indică tipul legăturii scindate: carbon-carbon liaze (4.1); carbon-oxigen liaze (4.2); carbon-azot liaze (4.3); carbon-sulf liaze (4.4); carbon-halogen liaze (4.5); fosfor-oxigen liaze (4.6) şi alte liaze (4.99). Urmează a treia cifră din cod, care indică grupele eliminate: grupă carboxil (4.1.1), carbonil (4.1.2), apa (4.2.1), amoniac (4.3.1) etc.

A.Piruvat decarboxilaza (E.C.4.1.1.1) sau 2-oxoacid carboxi-liaza catalizează reacția ireversibilă de forma generală:

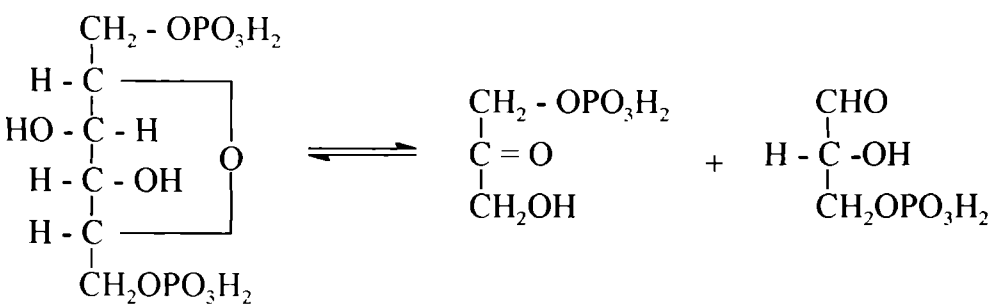


Piruvat decarboxilaza este o tiaminopirofosfat-enzimă. Decarboxilazele catalizează şi reacțiile de decarboxilare a α-aminoacizilor şi β-cetoacizilor. Coenzimele decarboxilazelor sunt: tiaminopirofosfatul (pentru β-cetoacizi) şi piridoxalfosfatul (pentru α-aminoacizi).

Decarboxilazele intervin în etapele unor cicluri metabolice ca fermentația alcoolică şi glicoliza, ca şi în degradările biochimice ale aminoacizilor în organismele inferioare (drojdii, bacterii, viruşi) şi în cele superioare.

B.Aldolazele catalizează reversibil reacția de condensare şi de decondensare aldolică. Această acțiune poate fi ilustrată printr-o secvență care intervine în fermentația alcoolică şi glicoliză.

Astfel, D-fructozo-1,6-difosfat D-gliceraldehid-3-fosfat-liaza (E.C.4.1.2.13) sau fructozo-difosfat aldolaza, catalizează reacția de scindare a D-fructozo-1,6-difosfatului la dihidroxiaceton fosfat şi D-gliceraldehid-3-fosfat.

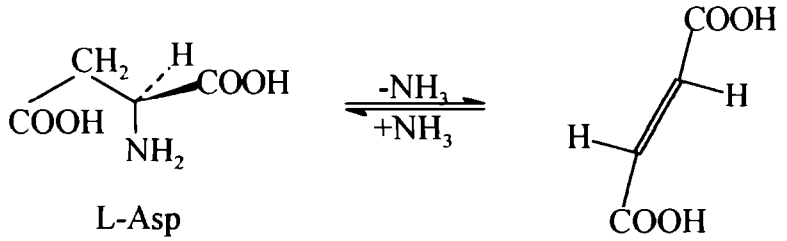


În reacția inversă (de aldolizare), enzima este o sintază (la fotosinteză).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

C. Enzimele din subclasa 4.3 catalizează reacții de formare de duble legături, cu eliminare de amoniac.

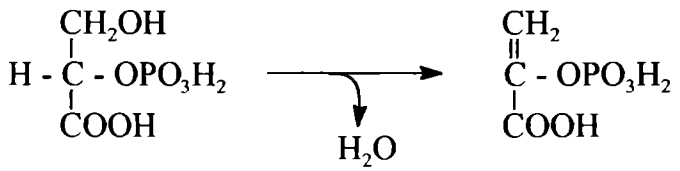
L-aspartat amoniac-liaza (E.C.4.3.1.1) sau aspartaza catalizează dezaminarea acidului L-aspartic:



L-Asp

Acid fumaric

D.Enolaza este o C-O-liază care catalizează deshidratarea acidului 2-fosfogliceric la acid 2-fosfoenolpiruvic, intervenind în fermentația alcoolică şi în glicoliză:



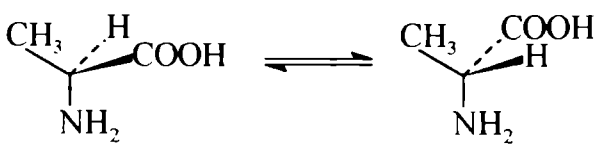
V.3.5. Izomeraze

În această categorie (clasa E.C.5) intră toate enzimele care catalizează interconversia izomerilor structurali şi a stereoizomerilor (enantiomeri şi diastereoizomeri).

Aceste enzime se pot clasifica în funcție de tipul de izomerie în: racemaze, epimeraze, cis-trans-izomeraze, tautomeraze, mutaze, cicloizomeraze etc. Astfel, din subclasa 5.1 fac parte enzimele care catalizează reacții de racemizare şi epimerizare la nivelul unui centru de chiralitate din substrat: aminoacid (5.1.1), hidroxiacid (5.1.2), glucid (5.1.3) etc.

A.Racemazele au drept cofactor piridoxalfosfatul şi prezintă importanță pentru organism, deoarece convertesc α-aminoacizii familiei sterice D (proveniți din surse exogene) în L-α-aminoacizi utili metabolismului specific al organismului.

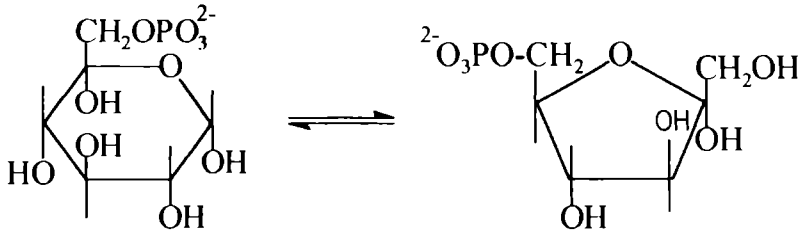
Alanin racemaza (E.C.5.1.1.1) catalizează izomerizarea L-Ala în D-Ala:



B.Epimerazele intervin în cicluri metabolice ca: fotosinteza, fermentația alcoolică, glicoliza, catalizând epimerizarea glucidelor.

Astfel, 6-fosfoglucozoizomeraza catalizează izomerizarea D-glucozo-6-fosfatului în D-fructozo-6-fosfat:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



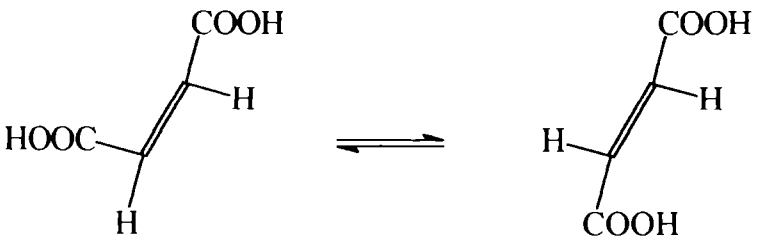
Glucozoizomeraza, care catalizează epimerizarea D-glucozei la D-fructoză, este utilizată în industria produselor zaharoase pentru obținerea siropului cu conținut înalt de fructoză şi calități edulcorante superioare:

D - Glucoză ⟶ D - Glucoză + D - Fructoză
50% 42%

Ca substrat se utilizează siropul de glucoză obținut din amidonul de porumb sau de cartofi, prin hidroliză enzimatică.

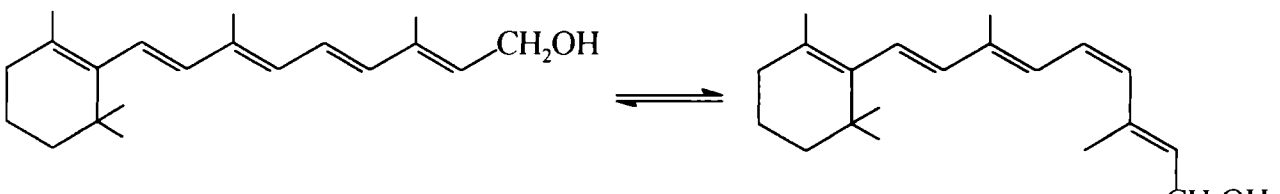
Sursa de glucozoizomerază este de natură microbiologică (Actinoplanes missouriensis, Streptomyces rubiginosus, Bacillus coagulans etc.).

C.Maleat cis-trans izomeraza (E.C.5.2.1.1) catalizează izomerizarea acidului maleic în diastereoizomerul său (acid fumaric):



Cis-trans izomerazele, prezente în toate organismele vii, intervin în conversia cis-trans a substratelor rezultate din degradarea glucidelor.

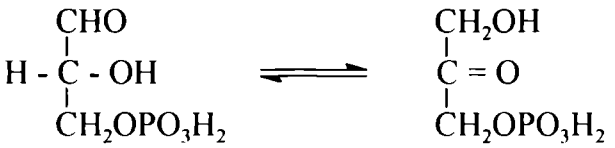
D.Retinen-izomeraza (total trans-retinen-11-cis-transizomeraza) participă la biochimia procesului vizual:



Retinol total trans 11-Cis-retinol

E.Triozofosfat izomeraza sau D-gliceraldehid-3-fosfat cetol-izomeraza (E.C.5.3.1.1) catalizează reacția de interconversie a D-gliceraldehid-3-fosfatului în dihidroxiaceton monofosfat, intervenind în metabolismul glucidelor:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



V.3.6. Ligaze (sintetaze)

Enzimele acestei clase (E.C.6) catalizează reacţii de sinteză activate pe seama energiei eliberate din scindarea unei legături pirofosfat din ATP sau din alţi compuşi similari:

$$A + B + ATP \xrightarrow{\text{ligază}} A - B + AMP + PP_i$$

Aceste enzime se mai numesc şi sintetaze; sub acţiunea lor biocatalitică se formează noi legături C-O (subclasa 6.1), C-S (6.2), C-N (6.3), C-C (6.4) etc.

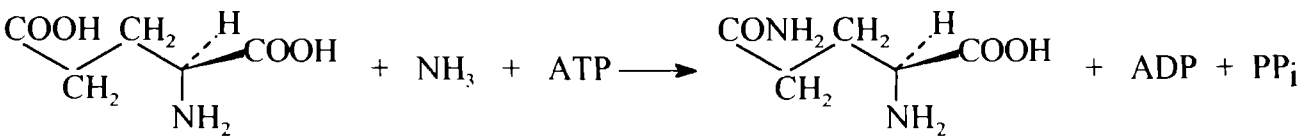
A.Aminoacil-ARNt ligazele catalizează formarea de legături C-O şi intervin în activarea aminoacizilor citoplasmatici sub formă de aminoacil-ARNt, necesari în biosinteza proteinelor.

Aceste ligaze sunt cuprinse în clasele 6.1.1.1-6.1.1.21:

$$\alpha\text{-aminoacid} + ARNt + ATP \longrightarrow \text{aminoacil - ARNt} + AMP + \text{pirofosfat}$$

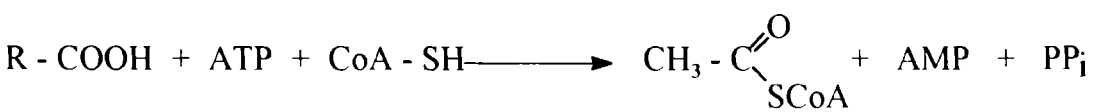
Enzimele au o înaltă specificitate de substrat (aminoacid); ele conţin una sau mai multe grupe SH şi necesită prezenţa ionilor Mg^{2+}.

B.Glutaminosintetaza sau L-glutamat amoniac ligaza, catalizează reacţia de formare a legăturii C-N, transformând L-glutamatul în L-glutamină:

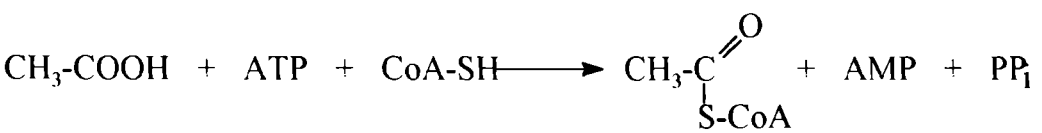


În mod similar este convertit şi acidul aspartic, cu obţinerea asparaginei, sub influenţa L-aspartat: amoniac ligazei (ADP formatoare) (E.C.6.3.1.4). Ambele reacţii prezintă interes în metabolismul proteic.

C.Acetil-CoA-ligazele sunt implicate în formarea de noi legături C-S. Aceste enzime catalizează reacţia de activare a acizilor carboxilici, necesari în diverse procese din metabolismul lipidelor, sub formă de acil-coenzimă A:



Astfel, CoA ligaza (AMP formatoare) (E.C. 6.2.1.1) sau acetil-CoA sintetaza catalizează reacţia:

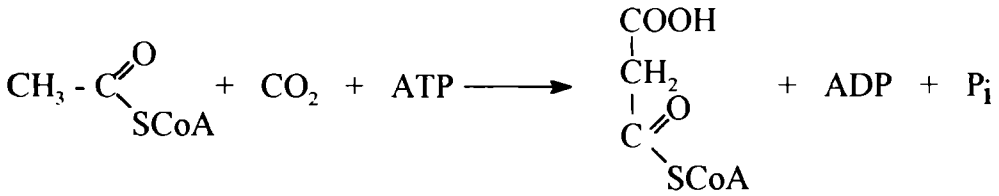


https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Acetil-CoA din drojdie poate utiliza propionatul în locul acetatului, dar nu şi alţi acizi (formic, butiric, caproic etc.).

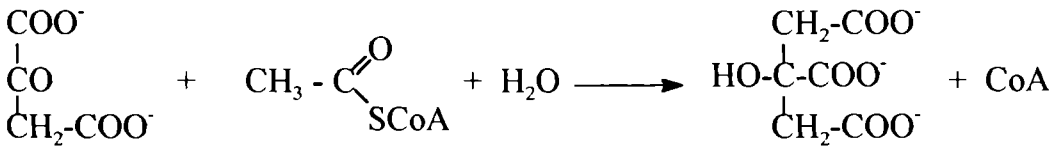
D.Carboxilazele (subclasa 6.4) catalizează reacţii de formare a unor noi legături C-C.

-Acetil-CoA carboxilaza (E.C.6.4.1.2) sau acetil-CoA: dioxid de carbon ligaza (ADP formatoare) catalizează reacţia:



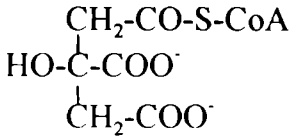
Enzima conţine biotina ca grupă prostetică, aceasta fiind un purtător intermediar de CO_2.

-În ciclul acidului citric, citrat sintetaza catalizează reacţia de conversie a oxalil-acetatului în citrat:



Oxalilacetat Citrat

Etapa intermediară în această reacţie este condensarea iniţială a oxalilacetatului cu acetil-CoA, în urma căreia se formează citril-CoA:



Urmează hidroliza intermediarului la citrat şi CoA. Această hidroliză deplasează reacţia globală spre formarea citratului.

V.4. Specificitatea de substrat a enzimelor

Specificitatea de substrat a unei enzime este legată de capacitatea sa de a "recunoaşte" substratul, formând cu el complexul intermediar enzimă-substrat, etapă obligatorie într-o reacţie enzimatică.

Specificitatea de substrat poate varia de la o specificitate restrânsă (în care enzima "recunoaşte" doar un singur substrat), până la o specificitate largă de grup, în care o enzimă poate forma complexe enzimă-substrat cu un număr mare de compuşi organici care conţin aceeaşi grupă funcţională. De asemenea, unele enzime prezintă o stereospecificitate numai faţă de unul dintre stereoizomerii (enantiomeri sau diastereoizomeri) unui substrat.

Importanţa specificităţii de substrat a enzimelor este deosebită pentru reacţiile metabolice din celulele vii.

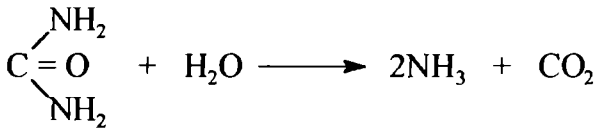
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

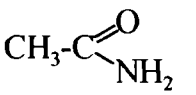
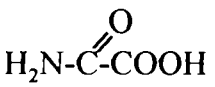
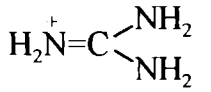
Pentru determinarea specificității de substrat s-au folosit preparate enzimatice de înaltă puritate, concentrații mici de enzime şi substrate înalt-purificate. Pe baza studiilor efectuate, enzimele au fost clasificate în patru categorii:

V.4.1. Enzime cu specificitate absolută de substrat

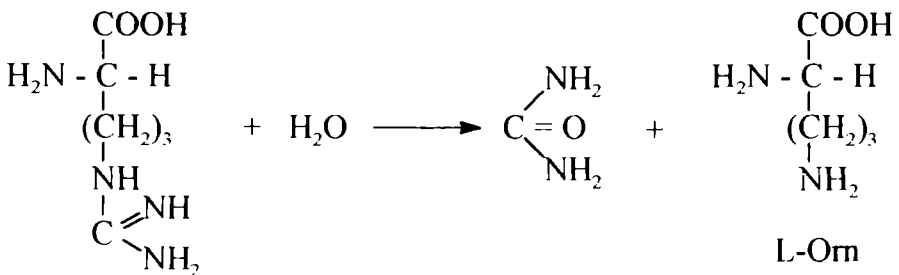
În această categorie intră un număr restrâns de enzime, care "recunosc" doar un singur substrat, fiind inactive față de analogii izoelectronici ai acestuia.

A.Ureaza, prima enzimă obținută în stare cristalină, constituie un exemplu clasic; enzima catalizează scindarea hidrolitică a ureei:



Situsul catalitic specific al ureazei, care "recunoaşte" ureea, nu poate forma complexe de tip enzimă-substrat cu compuşi înrudiți cu ureea ca: acetamida (); oxamida (); guanidina () etc., enzima fiind inactivă față de aceştia.

B.Arginaza catalizează reacția de hidroliză a L-Arg:



L-Arg L-Orn

Cu toate acestea, s-a arătat că arginaza este specifică şi pentru alte substrate, care prezintă caracteristicile următoare:

-prezența simultană a unei grupe carboxil şi a unei grupe guanidinil în substrat;

-poziția δ a grupei guanidinil în catenă, în raport cu grupa –COOH.

V.4.2. Enzime cu specificitate largă de grup

Majoritatea enzimelor pot cataliza o anumită reacție, fiind active față de substrate înrudite structural. Aceste enzime acționează asupra unor legături din molecula substratului, indiferent de structura chimică a restului moleculei sale.

Astfel:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

-Lipazele hidrolizează legăturile esterice din mono-, di- şi trigliceride, dar şi din alţi compuşi cu grupe esterice (esteri ai unor acizi organici cu alcooli aciclici şi chiar ciclici).

-Plasmina catalizează scindarea proteolitică a fibrinei, dar şi a altor proteine (caseina, hemoglobina), ca şi a unor esteri sintetici ai argininei şi lisinei.

-Leucinaminopeptidaza (din mucoasa intestinală şi din rinichi) catalizează scindarea hidrolitică a legăturii N-terminale a majorităţii resturilor de L-α-aminoacizi (cu excepţia prolinei) din peptide şi proteine.

V.4.3. Enzime cu specificitate restrânsă de grup

Aceste enzime acţionează asupra unor substrate cu structură chimică apropiată, posedând aceleaşi tipuri de legături.

A.Maltaza (α-D-glucozidaza) hidrolizează legătura 1,4-α-D-glucozidică din maltoză, dar şi din alte substrate cu legături α-glucozidice (zaharoză).

-Invertaza (β-D-fructozidaza) scindează hidrolitic legăturile β-D-fructozidice din: zaharoză, genţianoză, rafinoză, stahioză.

B.Colinesteraza serică hidrolizează esteri ai colinei ca: acetilcolina, benzoilcolina sau butirilcolina.

C.Chimotripsina pancreatică hidrolizează numai legăturile peptidice în care sunt angajate resturi ale aminoacizilor aromatici (Trp, Tyr, Phe).

D.Carboxipeptidaza A pancreatică hidrolizează legătura C-terminală ale resturilor de: Tyr, Phe, Trp din peptide şi proteine.

E.Carboxipeptidaza B din pancreas catalizează scindarea legăturilor C-terminale ale resturilor de Arg şi Lys din peptide şi proteine.

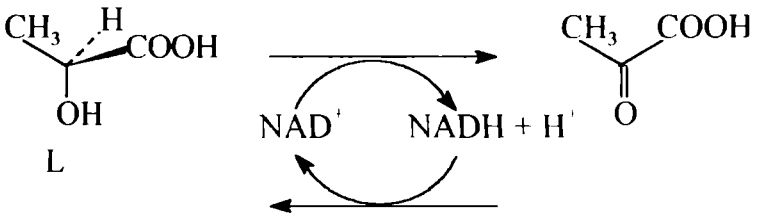
V.4.4. Enzime cu stereospecificitate de substrat

În această categorie se încadrează enzimele care acţionează asupra unuia dintre stereoizomerii (enantiomer sau diastereoizomer) substratului.

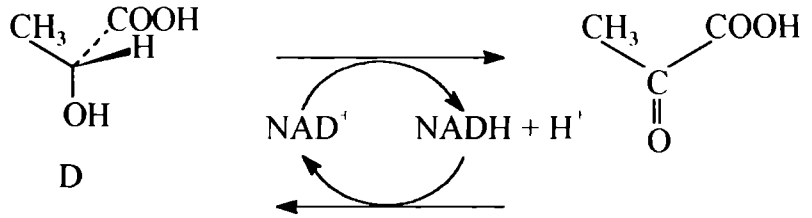
Atfel, enzimele cu enantiospecificitate "recunosc" doar unul dintre enantiomerii unui substrat racemic. Acest fenomen este de o importanţă majoră în procesele metabolice, în care majoritatea metaboliţilor fiind chirali, numai unul dintre enantiomeri participă la reacţii.

A.Lactat dehidrogenaza din muşchi şi din Bacillus subtilis catalizează oxidarea acidului L(+) lactic la acid piruvic:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

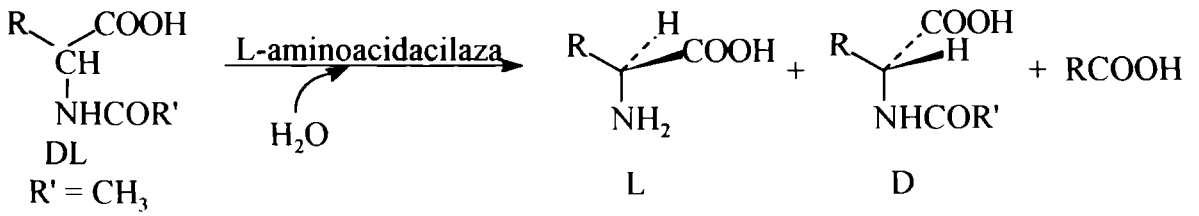


În schimb, enzima din Lactobacillus plantarum catalizează oxidarea acidului D(-) lactic:



B. O cale importantă de obținere a L-α-aminoacizilor naturali constă în scindarea enantiospecifică a racemicilor sintetizați în industria organică de sinteză.

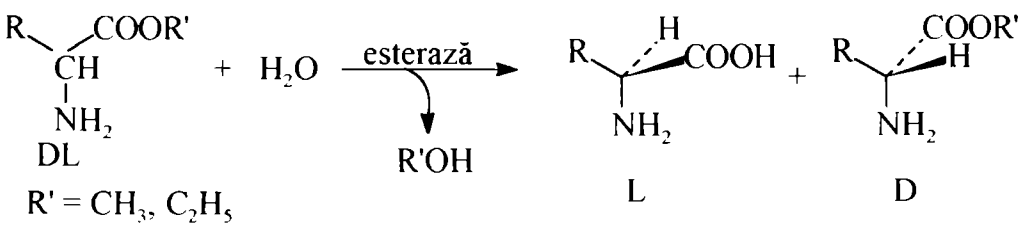
Una dintre metodele uzuale de scindare a racemicilor α-aminoacizilor N-acilați utilizează L-aminoacidacilaza din Aspergillus oryzae, care hidrolizează enantiospecific numai L-aminoacidul N-acetilat:



Pe această cale se obțin: L-Met, L-Val, L-Phe şi L-Trp.

Carboxipeptidazele izolate din rinichi sau pancreas de porc pot fi folosite în calitate de L-aminoacidoxidaze, pentru izolarea unor L-aminoacizi naturali din hidrolizatele de proteine.

O altă metodă de obținere a unor L-aminoacizi utilizează scindarea enantiospecifică a esterilor α-aminoacizilor racemici cu ajutorul unei esteraze:

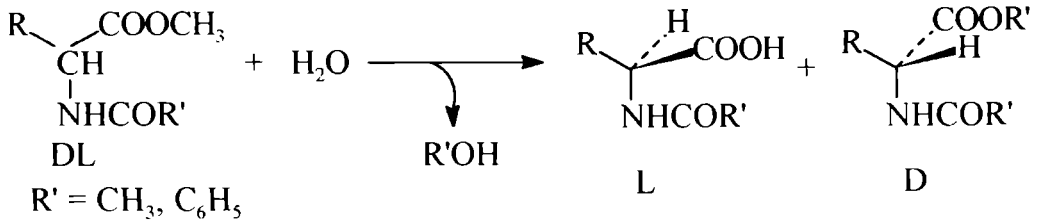


Astfel, subtilisina este utilizată pentru obținerea L-Phe şi L-Trp.

α-Chimotripsina catalizează specific hidroliza esterilor α-L-aminoacizilor aromatici (L-Phe, L-Tyr, L-Trp), dar şi hidroliza enantiospecifică a esterilor altor acizi aromatici chirali.

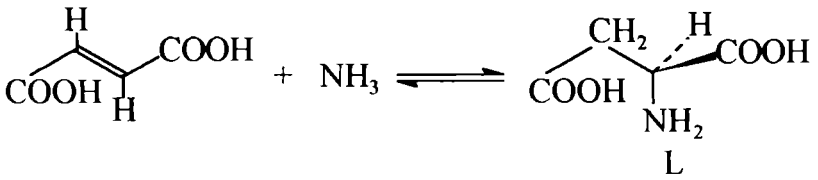
De asemenea, α-chimotripsina este folosită pe scară largă pentru hidroliza enantiospecifică a esterilor L-aminoacizilor N-acilați:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



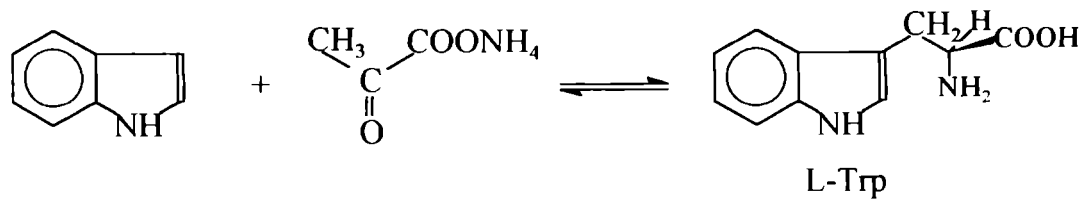
C.Sinteza asimetrică totală se poate realiza cu ajutorul unor enzime, plecând de la substrate chirale sau achirale.

Aspartaza sau L-aspartat amoniac-liaza (E.C.4.3.1.1) catalizează reacția de obținere a acidului L-Asp din fumarat:

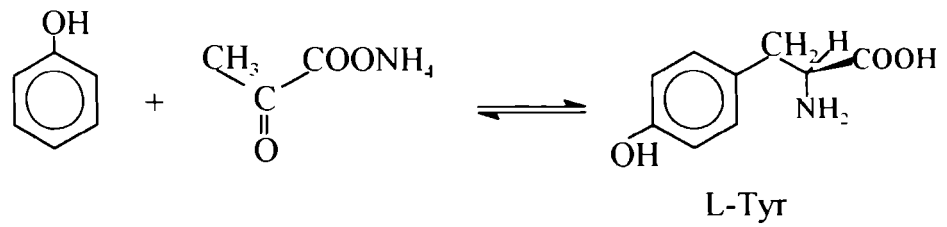


Enzima (intracelulară) se extrage din Escherichia coli.

Triptofanaza din Escherichia coli catalizează sinteza L-Trp din indol şi piruvat de amoniu:

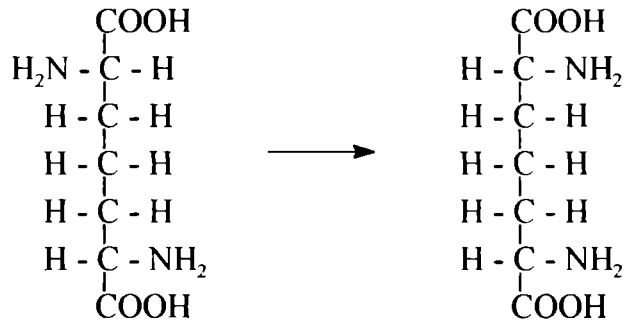


β-Tirozinaza din ciuperci catalizează sinteza asimetrică totală a L-Tyr:

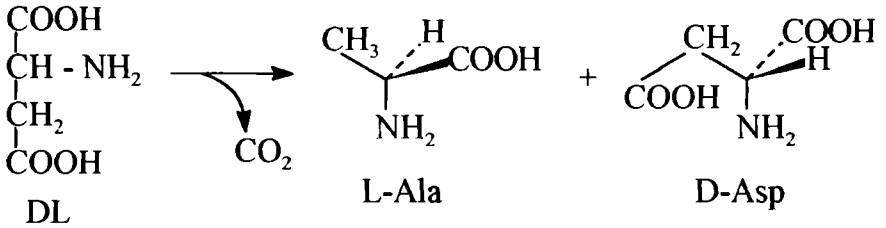


D.Un exemplu de interconversie a diastereoizomerilor cu ajutorul unei enzime este epimerizarea acidului treo-2,6-diaminopimelic în acid mezo-2,6-diamino-pimelic cu ajutorul diaminopimelat racemezei din Microbacterium ammoniaphilum:

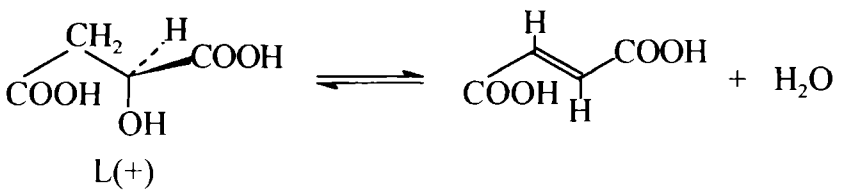
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



E.β-Aspartat-decarboxilaza din Pseudomonas tagnei sau Pseudomonas dacunhae catalizează obținerea L-Ala din acid DL-aspartic:



Pe baza stereospecificității lor, enzimele pot fi utilizate şi la obținerea unor diastereoizomeri achirali, plecând de la substrate chirale specifice. Astfel, fumarat hidrataza catalizează doar transformarea acidului L(+) malic în acid fumaric, enzima având specificitate atât pentru enantiomerul dextrogir al malatului cât şi (în sens invers) pentru diastereoizomerul E (fumarat):



D(-) malatul ca şi maleatul sunt inhibitori competitivi ai fumarat-hidratazei.

V.5. Importanța determinărilor de enzime în diagnosticarea unor maladii

Majoritatea reacțiilor enzimatice ca şi reglarea acestor procese având loc la nivel celular, laboratorul clinic poate stabili diagnostice, în special pe baza determinărilor de enzime în serul bolnavilor. Enzimele ajung în plasmă prin mai multe mecanisme:

-Pot fi secretate de regulă în ficat şi acționează asupra unor substrate din plasmă. Exemple de asemenea enzime sunt: protrombina, lecitin-colesterol aciltransferaza (LCAT), colinesteraza (CHE) etc. Scăderea activității plasmatice a acestor enzime indică o insuficiență funcțională a celulelor respective.

-Enzime conținute în secrețiile exocrine (amilaza pancreatică şi salivară, lipaza pancreatică, pepsinogenul gastric, fosfataza acidă prostatică) se varsă în canalele excretoare, doar o mică cantitate scapă în limfă şi de acolo în plasmă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Un procent crescut de asemenea enzime depistate în plasmă indică leziuni ale celulelor secretoare sau obstrucții ale canalelor excretoare.

-Enzimele celulare acționează exclusiv intracelular; creşterea concentrației lor în ser indică o alterare a membranei celulare, care permite scurgerea acestor enzime în lichidul interstițial, limfă şi plasmă. Asemenea enzime sunt: lactat dehidrogenaza (LDH), alaninamino-transferaza (ALAT), aspartataminotransferaza (ASAT), creatinkinaza (CK sau CPK) şi glutamatdehidrogenaza (GLDH).

În tabelul V.3 sunt indicate câteva exemple de enzime serice a căror determinare se utilizează la diagnosticarea unor maladii determinate de anomalii ale metabolismului celular.

Tabelul V.3 – Modificări ale prezenței unor enzime serice în diagnosticarea maladiilor

Enzima	Proveniență	Modificări patologice	Observații
Aspartat aminotransferază (AST, ASAT)	ficat, miocard, muşchi, mici cantități în plămâni, rinichi, pancreas, eritrocite	Creşteri marcate: infarct miocardic, hepatită acută, leziuni toxice ale ficatului Creşteri moderate: hepatite cronice, mononucleoză infecțioasă, colici biliare	În ficat: 60% în citosol; 40% în mitocondrii
Alanin-aminotransferază (ALT, ALAT)	citosolul hepatocitelor, mici cantități în rinichi, pancreas, miocard, muşchi	Creşteri marcate: hepatită acută şi leziuni toxice ale ficatului Creşteri moderate: hepatite cronice, mononucleoză infecțioasă, colici biliare	Localizată mai ales în hepatocitele de la periferia lobului hepatic
Lactat dehidrogenază (LDH)	musculatură, miocard, rinichi, eritrocite	Creşteri marcate: infarct miocardic, leziuni toxice ale ficatului, anemie megaloblastică Creşteri moderate: boli musculare, hemoliză, limfoame maligne, sindrom mieloproliferativ	Se disting 5 izoenzime: LDH_1, LDH_2 cresc în infarct miocardic şi anemie megaloblastică LDH_4, LDH_5 cresc în boli musculare şi leziuni acute ale ficatului

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabelul V.3 (continuare)

Enzima	Proveniență	Modificări patologice	Observații
Creatinkinaza (CK, CPK)	musculatură, miocard, creier	Creşteri importante: infarct miocardic, distrofie musculară progresivă, dermatomiozite rhabdomioliză Creşteri moderate: injecții intramusculare cu diazepam, tetracicline, hipotiroidism	S-au evidențiat 3 izoenzime: dimarice CKMM-musculară CKMB-specifică miocardului CKBB-din creier
γ-glutamil-transferaza (γGT, GGT)	rinichi, pancreas, ficat	Creşteri importante: colestază, alcoolism, tumori hepatice Creşteri moderate: hepatite cronice, pancreatite, tratament cronic cu barbiturice	Enzimă inductibilă
Colinesteraza (CHE)	secretată activ de către hepatocite	Scăderi importante: ciroză hepatică, intoxicații cu organofosforice Scăderi moderate: denutriție, hipotiroidism, anemii severe, reacție de fază acută Creşteri: sindrom nefrotic, obezitate androidă	S-au descris mutații care afectează activitatea CHE şi mai ales deficit de hidroliză a succinilcolinei

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

BIBLIOGRAFIE

1.**Allinger, N. L., Cava, M. P., de Jongh, D. C., Johnson, C. R., Lebel, N. A. şi Stevens, C. L.**, Chimie Organique, McGraw-Hill, Paris, 1983

2.**Avram, M.**, Antidăunători, Ed. Academiei, Bucureşti, 1974

3.**Beldeanu, D. D. şi Manta I.**, Biochimie medicală şi farmaceutică, vol.I, Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 1985

4.**Braun, J.**, Ghid clinic, Ediția a 5[a], Ed. Medicală, Bucureşti, 1997

5.**Bugg, T.**, Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry, Blackwell Science Ltd., 1997

6.**Cucuianu, M., Crîsnic, I. şi Pleşca-Manea, L.**, Biochimie clinică, Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 1998

7.**Crăciun T. şi Crăciun L. L.**, Dicționar de biologie, Ed. Albatros, Bucureşti, 1989

8.**Cuiban F. şi Lupea A-X.**, Studiul structurii şi sintezei peptidelor, Ed. Academiei R.S.R., Bucureşti, 1989

9.**Dinu, V., Truția, E., Popa-Cristea, E. şi Popescu, A.**, Biochimie medicală. Mic Tratat, Ed. Medicală, Bucureşti, 1996

10.**Dumitru, I. F.**, Biochimie, Ed. Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1980

11.**Dumitru, I. F. şi Iordăchescu, D.**, Introducere în enzimologie, Ed. Medicală, Bucureşti, 1981

12.**Gârban, Z.**, Tratat elementar de biochimie, vol.I, partea a IIa, Ed. Mitron, Timişoara, 1996

13.**Gioabă, A.**, Biochimie, Centrul de multiplicare IPB, 1984

14.**Lehninger, A. L.**, Biochimie, vol.I şi II, Ed. Tehnică, Bucureşti, 1987

15.**Métais, P., Agnery, J., Férurd, G., Fruchart. J.-Ch., Jardillier, J.-C., Revol, A., Siest, G. şi Stahl, A.**, Biochimie clinique, Simep Edition, Villeurbanne, France, 1979

16.**Neamțu, G.**, Biochimie vegetală, Ed. Ceres, Bucureşti, 1981

17.**Neamțu, G., Câmpeanu, G. şi Enache, A.**, Dicționar de biochimie vegetală, Ed. Ceres, Bucureşti, 1989

18.**Nenițescu C. D.**, Chimie Organică, vol.I şi II, ediția a VIIIa, Ed. Diadactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1980

19.**Popa, E.**, Biocatalizatori imobilizați, vol.II, Ed. Universității din Bucureşti, 1997

20.**Popescu, A., Cristea, E. şi Zamfirescu-Gheorghiu, M.**, Ed. Medicală, Bucureşti, 1980

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

21.**Scriban, R.** (coordonateur), Biotechnologie, ed. a IV[a], Ed. Technique et Documentation-Lavoisier, Paris, 1993

22.**Stryer, L.**, Biochemistry, ediția a III[a], W. H. Freeman and Company, N. Y., 1998

23.**Şerban, M., Tamaş, V. şi Cotruţ, M.**, Biochimie medicală veterinară, Ed. Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1981

24.**Voet, D. şi Voet, J. D.**, Biochemistry, John Wiley and Sons, N. Y., 1990

%

VERIFICAT 2007

VERIFICAT 2007

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ BUCUREŞTI

VERIFICAT 2007

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tiparul s-a executat sub cda 825/2001
la Tipografia Editurii Universității din Bucureşti

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

BIBLIOTECA
UNIVERSITAR

DE SPIRITU

DATA RESTITUIRII	
14 DEC. 2001	
10 IAN. 2002	
28 MAI. 2002	
22 IUN. 2002	
27 AUG. 2002	3. IUN. 2005
28. AUG. 2002	22. APR. 2009
29. AUG. 2002	30. MAI. 2013
2. OCT. 2002	
13. IAN. 2003	22 NOV. 2017
	22 NOV. 2017

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

80 000 lei

ISBN: 973-575-565-3

Lei 80000

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro